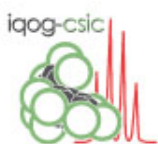




FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

SÍNTESIS Y MERCADO DE ANÁLOGOS DE TETRODOTOXINA

Memoria que presenta
NURIA TABARÉS CANTERO
para optar al grado de
Doctora en Ciencias Químicas



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



**PARQUE
CIENTÍFICO
DE MADRID**

INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL
DEPARTAMENTO DE SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES
DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS

Madrid, 2012

*A mis padres, por ser como son.
A Pedro y a mis hijos, por hacer cada día especial.*

*“Hay una fuerza motriz más poderosa
que el vapor, la electricidad y la energía
atómica: la voluntad”*

Albert Einstein

*“Dicen que soy héroe, yo débil, tímido,
casi insignificante, si siendo como soy hice
lo que hice, imagínense lo que pueden
hacer todos ustedes juntos”*

Mahatma Gandhi

ÍNDICE

Agradecimientos	<i>i</i>
Abreviaturas y Acrónimos	<i>v</i>
Nomenclatura	<i>ix</i>
INTRODUCCIÓN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. LA FAMILIA DE LOS ALCALOIDES GUANIDÍNICOS	5
II. TETRODOTOXINA	17
A. Aislamiento de Tetrodotoxina (TTX)	17
B. Estructura de Tetrodotoxina (TTX)	20
C. Análogos naturales de TTX	25
D. Actividad biológica de TTX	30
D.1. Canales de Sodio Dependientes del Voltaje (Na _v)	30
D.1.1. Clasificación de los Canales Na _v	31
D.1.2. Estructura de los Canales Na _v	33
D.1.3. Funcionamiento de los Canales Na _v	36
D.2. Interacción entre TTX y los Canales Na _v	38
D.3. Relación Estructura-Actividad de TTX	42
D.4. Propiedades Farmacológicas de TTX	44
D.4.1. Toxicidad de TTX	44
D.4.2. Posible Uso Terapéutico de TTX	45
E. Biosíntesis de Tetrodotoxina	46
F. Síntesis de Tetrodotoxina	48
F.1. Síntesis Totales de TTX	49
F.1.1. Síntesis de <i>rac</i> - TTX de Kishi y col.	50
F.1.2. Síntesis de (–)-TTX de Isobe y col.	54
F.1.3. Síntesis de (–)-TTX de Du Bois y col.	65
F.1.4. Síntesis de <i>rac</i> - TTX de Sato y col.	68
F.2. Tabla Resumen de las Síntesis Totales de TTX	72

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	75
OBJETIVOS	77
PLAN DE TRABAJO	77
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	81
CAPÍTULO 1. EL MERCADO DE LA TETRODOTOXINA Y DE SUS ANÁLOGOS	83
1. EL MERCADO DE LA TETRODOTOXINA Y DE SUS ANÁLOGOS	85
1.1. El mercado de la salud	86
1.1.1. El mercado de la analgesia	90
1.1.2. El mercado de la cosmética	100
1.1.3. Heavy drugs	103
1.1.4. Nuevas tecnologías	106
1.1.4.1. Espectrometría de Masas	106
1.1.4.2. PET (<i>Positron Emission Tomography</i>)	108
1.2. El mercado de la seguridad y la defensa	110
1.2.1. La falsificación de medicamentos: Una amenaza creciente	112
1.2.2. Armas de destrucción masiva (ADM)	115
1.2.3. Materiales de referencia (MR)	121
CAPÍTULO 2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL <i>CORE</i> DE TETRODOTOXINA	127
2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL <i>CORE</i> DE TETRODOTOXINA	129
2.1. Preparación del producto de partida de las dos rutas:	
Síntesis de la ciclohexenona-espiro- β -lactama 6	129
2.1.1. Preparación de <i>N</i> -benciloxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (17)	132
2.1.2. Preparación de <i>N</i> -cloro- <i>N</i> -alcixiamida 18 y de la ciclohexadienona-espiro- β -lactama 19	133
2.1.3. Preparación del 1.2-diol 20	140
2.1.4. Protección del diol 20 con el grupo bifuncional TIPDS	145

2.2. Ruta A: Preparación de los análogos del <i>core</i> de Tetrodotoxina, Nitroalcohol 2 , alqueniléster 3 y α -cetoéster 4	152
2.2.1. Preparación del cianobenciliden acetal 8	153
2.2.1.1. Preparación del dieno 21	154
2.2.1.2. Preparación del diol 22	160
2.2.1.3. Protección selectiva del hidroxilo primario del diol 22	169
2.2.1.4. Epoxidación diastereoselectiva del doble enlace $\Delta^{8(9)}$ de los benzoatos 7a-c	175
2.2.1.5. Apertura del epoxialcohol 31a . Síntesis del cianobenciliden acetal 8	184
2.2.1.6. Reactividad del cianobenciliden acetal 8	190
2.2.1.6.1. Preparación del benzoatotriol 34 a partir del cianobenciliden acetal 8	190
2.2.1.6.2. Preparación del benzoatodimetilacetal 37	191
2.2.1.6.3. Preparación de la benzoatolactona 8	192
2.2.1.6.4. Preparación de la cianobencilidenona acetal 41 y su hidrato 42	192
2.2.2. Preparación del nitroalcohol 2 . Subruta A1	197
2.2.3. Síntesis del alqueniléster 3 . Subruta A2	202
2.2.3.1. Protección del hidroxilo terciario del alqueniléster 3	206
2.2.3.2. Preparación de los benzoatos 50 , 51 y 52	207
2.2.4. Síntesis del α -cetoéster 4	210
2.2.4.1. Preparación de los dioles 53 y <i>epi</i> - 53	210
2.2.4.2. Preparación de los α -cetoésteres 4 y <i>epi</i> - 4	214
2.3. Ruta B: Preparación del aminoalcohol 5	218
2.3.1. Preparación de la ciano- β -lactona 9	218
2.3.2. Síntesis cianoacetal 10	227
2.3.2.1. Preparación del cianoalqueno 57	228
2.3.2.2. Preparación del 1,2-diol 58	233
2.3.2.3. Preparación del cianoacetal 10	239
2.3.3. Síntesis aminoalcohol 5	242
2.3.3.1. Preparación del acetaldehído 61	242
2.3.3.2. Preparación del aminoalcohol 5	245
2.3.3.3. Preparación del aminotriol 62	247
CONCLUSIONES	251

PARTE EXPERIMENTAL	261
<i>MATERIALES Y MÉTODOS</i>	263
<i>A. Disolventes y Reactivos</i>	263
<i>B. Procedimientos Generales</i>	263
<i>C. Técnicas y Aparatos</i>	264
 1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL <i>CORE</i> DE TETRODOTOXINA	268
1.1. Síntesis del producto de partida de las dos rutas:	
Síntesis de la ciclohexenona-espiro- β -lactama 6	268
1.1.1. Síntesis de <i>N</i> -(benciloxi)-2-(4-metoxifenil)acetamida (17)	268
1.1.2. Síntesis de <i>N</i> -cloro- <i>N</i> -alcoxiamida 18 y de ciclohexadienona-espiro- β -lactama 19	270
1.1.3. Síntesis del 1,2-diol 20	272
1.1.4. Protección del diol 20	274
1.1.4.1. Protección simultánea con el grupo bifuncional TIPDS	274
1.1.4.2. Diprotección simultánea con el grupo bifuncional DMP	276
1.1.4.3. Monoprotección selectiva del diol 20	277
1.1.4.4. Protección del alcohol 12	280
Reordenamiento de la espiro- β -lactama 6 promovido por TMSOTf	284
1.2. Ruta A: Síntesis de los análogos del <i>core</i> de Tetrodotoxina, nitroalcohol 2 , alquenciléster 3 y α -cetoéster 4	286
1.2.1. Síntesis del cianobenciliden acetal 8	286
1.2.1.1. Síntesis de los dienos conjugados 21 y 25	286
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-butil- 5,6,7-trihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano- 1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (66)	293
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-butil- 6-[(<i>terc</i> -butildime-tilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]- 1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (67)	294

Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-7,10-epoxi-5,6-dihidroxi-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (68)	296
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-6-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-7,10-epoxi-7-metil-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (69)	297
1.2.1.2. Síntesis de los dioles 22 y 29	299
1.2.1.3. Protección selectiva de los hidroxilos primarios de los dioles 22 y 29	302
1.2.1.4. Epoxidación diastereoselectiva del doble enlace de las ciclohexeno espiro-β-lactamas 7a-c y 70	309
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-7-[4(benzoiloxi)metil]-6-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-5-[(trimetilsililoxi)]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (70)	316
1.2.1.5. Apertura del epoxialcohol 31a .	
Síntesis del cianobenciliden acetal 8	318
Intento de apertura del epóxido 70 : Reacción de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(<i>terc</i> -butil-dimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-aza-espiro[3.5] nonan-2-ona (70) con Et ₂ AlCN	320
Síntesis del equivalente sintético del cianobenciliden-acetal 8	322
Dihidroxilación de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5] non-8-en-2-ona (30)	322
Protección de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (72)	325
Desprotección <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopro-pildisiloxano-1,3-diil)-9-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (74)	327
1.2.1.6. Reactividad del cianobenciliden acetal 8	330

Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R_N</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (34)	330
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R_N</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-7,9- <i>O</i> -isopropiliden-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraiso-propildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (37)	332
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-9-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-6,7,8-trihidroxi-6,7- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (36)	335
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-6,7,8,9-tetrahidroxi-6,7- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (38)	336
Síntesis de 1-hidroxi-1λ ⁵ ,2-benzoyodoxol-1,3-diona (IBX, 40)	339
Síntesis de la cianobencilidenona 41 y su hidrato 42	340
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R_N</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (44)	345
Síntesis <i>rac</i> -(1 <i>R_N</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (43)	348
Reacción <i>rac</i> -(1 <i>R_N</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metiloxi]-8-[(<i>terc</i> -metilbutildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (44) con DABCO cat.	350

Síntesis de <i>rac</i> -(1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-9-ciano-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (46)	352
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(<i>terc</i> -butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (47)	353
1.2.2. Síntesis del nitroalcohol 2 .	355
Síntesis de [(Metoxicarbonil)metilen]trifenilfosforano	357
1.2.3. Síntesis de <i>rac</i> -(<i>Z</i> ,1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)	358
1.2.3.1. Protección del hidroxilo terciario de <i>rac</i> -(<i>Z</i> ,1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-aza-espiro[3.5]nonan-2-ona (3)	360
1.2.3.2. Hidrólisis de <i>rac</i> -(<i>Z</i> ,1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)	363
Hidrogenación de <i>rac</i> -(<i>Z</i> ,1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)	370
1.2.4. Síntesis de <i>rac</i> -(1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)-[8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxicarbonil)-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (4)	373

1.2.4.1. Dihidroxilación de <i>rac</i> -(<i>Z</i> ,1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>R</i>)- 1-benciloxi-8,10-(cianofenilmetilendioxi)-9-(metoxicarbonil) metilen-5,6,7-trihidroxi-7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3- tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespi-ro[3.5]nonan-2ona (3)	373
1.2.4.2. Síntesis de <i>rac</i> -(1' <i>R</i> ,1 <i>R</i> _N ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i>)-1-(benciloxi)- [8,10- <i>O</i> -ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9- (metoxicarbonil)-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1- azaspiro[3.5]nonan-2ona (4)	375
1.3. Ruta B: Síntesis del aminoalcohol 5	380
1.3.1. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-9-ciano- 5,6-dihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1- azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (9)	380
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-6-[(<i>terc</i> - butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro [3.5]nonano-2,7-diona (78)	385
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-9-ciano-1,5,6- trihidroxi-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano- 1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (56)	389
Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-9-ciano-5,6-trihidroxi- 5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1- azaspiro-2,7-diona (80)	390
1.3.2. Síntesis del Cianoacetal 10	391
1.3.2.1. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6- dihidroxi-7-metiliden-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)- 1-aza-espiro[3.5]nonan-2ona (57)	391
1.3.2.2. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)-9- ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3- tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (58)	393

1.3.2.3. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> _N ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,9 <i>R</i>)-1-(benciloxi)- 9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10- <i>O</i> -isopropiliden- 7-metil-5,6- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)- 1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (10)	398
1.3.3. Síntesis del aminoalcohol 5	400
1.3.3.1 Síntesis del <i>rac</i> -(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-1-[(benciloxi)amino]-6- ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7- <i>O</i> -isopropiliden-4-metil- 2,3- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (61)	400
1.3.3.2. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-1-[(benciloxi)amino]- 6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4-metil-4,7- <i>O</i> - isopropiliden-2,3- <i>O</i> -(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano- 1,3-diil)-ciclohexano (5)	402
1.3.3.3. Síntesis de <i>rac</i> -(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-1-[(benciloxi)amino]- 6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4,7- <i>O</i> - isopropiliden-4-metil-ciclohexano (62)	406
ANEXO A: DATOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X	A1
ANEXO B: ESPECTROS DE RMN SELECCIONADOS	B1
ANEXO C: LISTADO DE PATENTES DIRIGIDAS HACIA LA SÍNTESIS TOTAL DE TTX	C1

AGRADECIMIENTOS

La parte experimental de esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Síntesis, Estructura y Propiedades de los Compuestos Químicos (S.E.P.C.O.) del Instituto de Química Orgánica General (I.Q.O.G.) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), en los laboratorios de Dr. Esteve S.A. en su sede de Barcelona y en el Laboratorio Dimitri Mendeleiev de la Fundación Parque Científico de Madrid (F.P.C.M.) en sus sedes de la BP Solar de Tres Cantos, del Parque Tecnológico de Tres Cantos y del CLAID de Cantoblanco, bajo la dirección del Dr. Pedro Noheda Marín, Científico Titular del Instituto de Química Orgánica General.

Agradezco a los directores que el Instituto ha tenido durante este tiempo, la Dra. Ofelia Nieto, el Dr. Bernardo Herradón y el Dr. Eduardo García-Junceda por su acogida y disponibilidad.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por el proyecto de investigación titulado “Síntesis Total y Estudios Biológicos de Tetrodotoxina y Análogos” suscrito entre Laboratorios Dr. Esteve S.A. y el C.S.I.C. (investigador responsable: Dr. Pedro Noheda Marín), y por una beca predoctoral asociada al mismo y por el Proyecto Intramural Especial (P.I.E.) titulado “Proyecto PREGENERA para el establecimiento de una spin-off de síntesis de productos naturales”.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a todo el personal técnico, investigador y en formación tanto del centro de Química Orgánica (CENQUIOR) del CSIC como de la Fundación Parque Científico de Madrid (FPCM) por su acogida, su disponibilidad y por la ayuda que me han prestado a la hora de resolver cualquier problema que ha surgido en mi camino.

Primero, me gustaría agradecer a las personas con las que más tiempo he compartido durante todos estos años, mis compañeros del grupo de investigación, aunque sin olvidarme de los compañeros de mi anterior grupo con los que empecé a caminar por un laboratorio de Química Orgánica. Ellos me han enseñado muchas cosas y junto a ellos, entre matraces y reacciones, he vivido momentos maravillosos e inolvidables y he superado las dificultades con las que me he ido encontrando.

Gracias Luis no sólo por todo lo que aprendí de ti cuando llegué al grupo de investigación, sino también por “emprender” juntos otros caminos. Gracias Raúl por los momentos compartidos en el laboratorio, por esas discusiones tan constructivas acerca de conformaciones y asignaciones estructurales, y por supuesto, por estar siempre dispuesto a ayudarme con las dificultades que presenta la escritura y correcciones de lo que supone una tesis como esta, implicándote como si de tu tesis se tratase. Gracias David por hacer esos maravillosos espectros cuando casi no sabía ni lo que eran, por tu generosidad y porque siempre has estado dispuesto a echar una mano. Gracias Dani por enseñarme los recovecos de la nomenclatura.

No podría dejar de agradecer a mucha gente que ha pasado por el grupo durante todo este tiempo, gracias a Sergio, con quién inicié este proyecto tan interesante y con el que tanto he aprendido y gracias a Ana con quien tantos productos purifiqué.

También me gustaría expresar mi gratitud a toda la gente de mi anterior grupo de investigación, gracias Aida por tu apoyo y confianza, gracias Mariola por estar siempre dispuesta a compartir todos tus conocimientos conmigo, gracias Mercedes por nuestros desahogos y nuestras risas, gracias a Alex por saber sacar siempre una sonrisa y gracias Jorge por ser mi “mini” e intentar enseñarme lo que sabías. Gracias Felipe, por todos los buenos momentos y por tu

total disponibilidad tanto dentro como fuera del laboratorio. Gracias también a Ana, Raquel, Nadia y Nacho. Sin todos vosotros esto no hubiese sido igual.

No quisiera olvidarme de Valentín, Miguel y Gabriel, que a pesar de llegar en esta última etapa sé que cuento con vosotros.

No podía olvidarme de mis padres de quienes me siento tan orgullosa y a los que tanto tengo que agradecer. Gracias mamá y papá por vuestro esfuerzo para hacer de mí la persona que hoy soy, por apoyarme y animarme siempre, por comprenderme y enseñarme a luchar por lo que se quiere, por inculcarme los valores que algún día me gustaría ver en mis hijos y porque sé que sin vosotros no lo hubiera conseguido. Gracias mamá por enseñarme a ver siempre el lado positivo y a no preocuparme por los problemas porque todos tienen solución. Espero poder darles a mis hijos todo lo que me habéis dado a mí, el mejor y más hermoso regalo.

Y por supuesto la persona a la que más tengo que agradecerle, tanto personal como profesionalmente, gracias Pedro, por enseñarme que todo es a la vez, por hacerme disfrutar poniendo reacciones y analizando espectros juntos, por la química que forme parte de “mitu” vida y sobre todo por la química que existe entre nosotros. ¡Me has enseñado tanto! Gracias por querer recorrer junto a mí el camino de la vida, por confiar en mí, por comprenderme, por quererme y apoyarme siempre, por hacerme la persona más feliz del mundo y formar contigo la familia de mis sueños, por querer con locura a “mistusnuestros” hijos y ser de Never. Y por último, aunque no por ello menos importante, gracias Adrián por hacerme sentir madre, por todo el cariño que me das y por todo lo que día a día me haces sentir, gracias Carlos, por aceptarme tal y como soy y querer compartir parte de tu vida conmigo y gracias Álvaro que sin haber llegado todavía a este mundo ya me haces quererte con locura y sentir cosas maravillosas. Gracias Pe, Adri, Tar y Álvaro, sin vosotros mi vida no tendría sentido. Os quiero con locura.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Para los aspectos químicos, en esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en *Guidelines for Authors of the American Chemical Society*.¹ Además, se han utilizado las siguientes:

A _{1,2}	adición nucleófila 1,2 en sistemas enónicos
A _{1,4}	adición nucleófila 1,4 en sistemas enónicos
Ác.	ácido
A.E.	Análisis Elemental
API-ES	ionización a presión atmosférica por electrospray
ax	axial
BOC	<i>tert</i> -butoxicarbonilo
c	cuadruplete
<i>m</i> -CPBA	ácido 3-clorobencenoperoxoico
col.	colaboradores
cuant.	cuantitativo
disol.	disolución
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
dd	doble doblete
DIBAL	hidruro de isobutilaluminio
DMAP	4-(dimetilamino)piridina
ec	ecuatorial

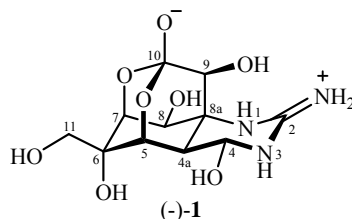
¹ Coghill, A. M.; Garson, L. R. *The ACS Style Guide: Effective Communication of Scientific Information*; Oxford University Press: New York, 2006. pp.: 169-202.

EOM	etoximetilo
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IBX	1-hidroxi-1 λ^5 ,2-benzoyodoxol-1,3-diona
LRMS	espectrometría de masas de baja resolución
M ⁺	pico molecular
MbkDa	Molecule bellow KiloDalton
NMO	4-óxido de 4-metilmorfolina
PCC	clorocromato de piridinio
P.eb.	punto de ebullición
P.f.	punto de fusión
PMB	<i>para</i> -metoxibencilo
PMP	<i>para</i> -metoxifenilo
q	quintuplete
rto.	rendimiento
sat.	disolución acuosa saturada
<i>sist.</i>	Sistema
STX	saxitoxina
sx	sextuplete
t.a.	temperatura ambiente
TBAF	floruro de tetrabutylamonio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBHP	hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo

TFA	ácido trifloroácetico
TIPDS	1,1,3,3-tetraisopropildisiloxan-1,3-diilo
TTX	tetrodotoxina

NOMENCLATURA^{1,2}

La numeración empleada para la (-)-tetrodotoxina (TTX), (-)-**1**,³ será la indicada a continuación:



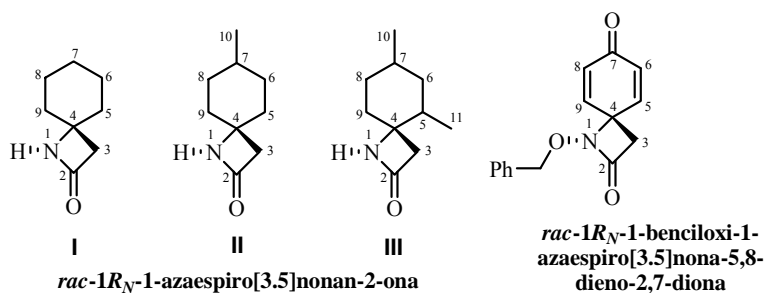
Las estructuras heterocíclicas espiránicas[3.5] sintetizadas, estructuras **I**, **II** (conteniendo el C-11 característico de la TTX) y **III** (conteniendo los carbonos C-4 y C-11 propios de la TTX), se nombrarán y numerarán como derivados de 1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona.⁴

¹ La numeración de la bibliografía de esta Memoria es independiente para cada una de las Partes en las que se divide y las citas bibliográficas se podrán encontrar al pie de página.

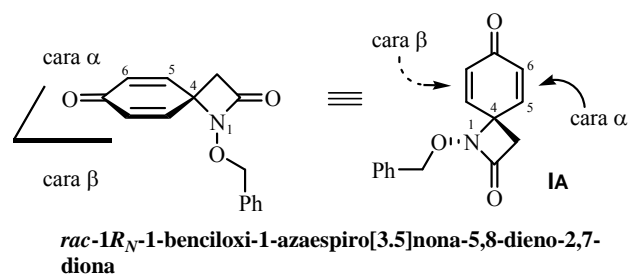
² (a) Fernández, E.; Fariña, F. *Nomenclatura de la Química Orgánica (IUPAC)*. Secciones A, B, C, D, E, F y H; C.S.I.C., Real Sociedad española de Química: Madrid, 1987. (b) IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 1327-1330.

³ (a) La numeración para los compuestos de la familia de la tetrodotoxina, encontrada en la bibliografía, difiere de la recomendada por la IUPAC, que numera todos los átomos de la estructura base, incluidos oxígenos y nitrógenos. (b) A modo de ejemplo, se muestra el nombre sistemático de dos compuestos de la familia de la tetrodotoxina, de acuerdo con IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 143-216 y IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 1307-1375: (4R,4aR,5R,6S,7S,8S,8aR,10S,12S)-2-azanioilideno-4,6,8,12-tetrahidroxi-6-(hidroximetil)-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-1H-8a,10-metano-5,7-(epoximetanooxi)quinazolin-10-olato ((-)-**TTX**) y (4R,4aR,5R,6S,7S,8S,8aR,10S,12S)-2-azanioilideno-4,6,8,12-tetrahidroxi-2,3,4,4a,5,6,7,8-octahidro-1H-8a,10-metano-5,7-(epoximetanooxi)quinazolin-10-olato ((-)-**11-nor-(6S)-TTX-ol**). Por otro lado, el número de registro CAS de la TTX es el 4368-28-9, ver: *Chemical Abstracts Service*, 9th *Collective Index Nomenclature* (CAS-9CI, 1972-1976).

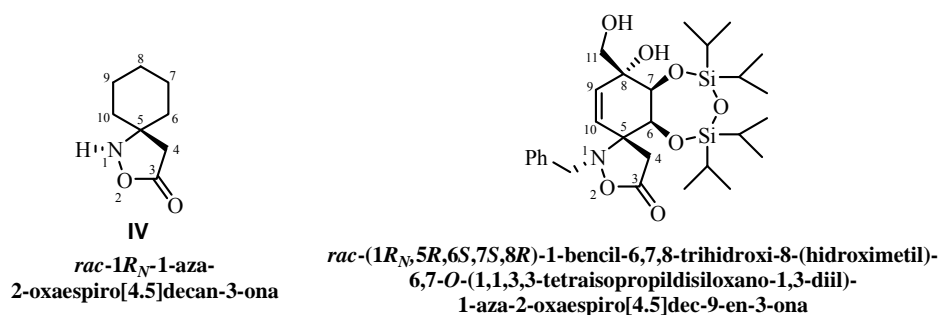
⁴ Para la nomenclatura de espirocompuestos, ver: IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 531-558.



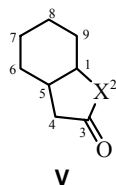
En estas estructuras espiránicas, estructuras **I**, **II** y **III**, se llamará cara β a la cara del plano definido por tres de los carbonos de anillo de seis miembros (por ejemplo, en el caso de **IA** los carbonos C-4, C-5 y C-6) en la que se encuentra el nitrógeno N-1 del anillo de β -lactama. Se llamará cara α a la opuesta a la cara β .



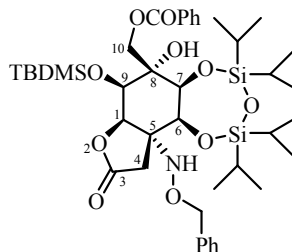
Las estructuras heterocíclicas espiránicas[4.5] sintetizadas, estructuras **IV**, se nombrarán y numerarán como derivados de 1-aza-2-oxaespiro[4.5]decan-3-ona.



Las estructuras bicíclicas no espiránicas sintetizadas, estructuras **V**, se nombrarán y numerarán según las reglas establecidas por la IUPAC (extensión del sistema de Von Baeyer)⁵ para los hidrocarburos con puentes, indicando los heteroátomos por reemplazamiento.

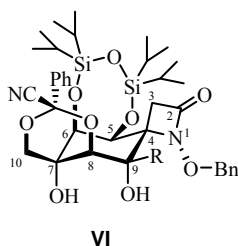


V
2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (X = O)
2-azabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (X = N)

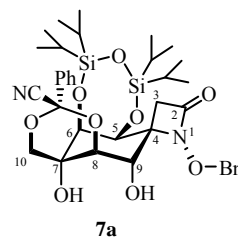


rac-(1*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-
5-(benzoxiamino)-8-(benzoxiloximetil)-
9-(*tert*-butildimetilsililoxi)-6,7,8-trihidroxi-
6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-
2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona

Las estructuras heterocíclicas espiránicas[3.5] sintetizadas, estructuras **VI** se nombrarán y numerarán como derivados de 1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona.



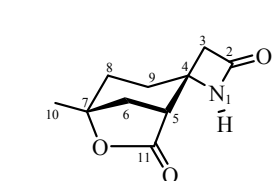
VI
rac-(1'*R*,1*R*_N)-1-(benziloxi)-[8,10-*O*-
ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-
5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-
1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona



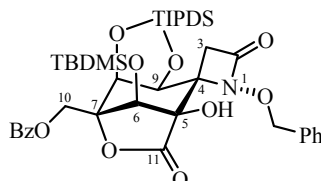
7a
rac-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benziloxi)-
[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-
hexahidroxi-7-metil-
5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-
1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona

⁵ IUPAC, Commission on Nomenclature of Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71, 513-529.

Las estructuras tricíclicas espiránicas[3.5] sintetizadas, estructuras **VII**, se nombrarán como derivados de 1-azaespiro[3.5]nonano-2-ona-5,7-carbolactona y se numerarán de acuerdo a la numeración establecida para las estructuras **III**.

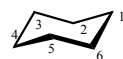


VII
rac-1*R*_N-1-
azaespiro[3.5]nonan-2-ona-
5,7-carbolactona

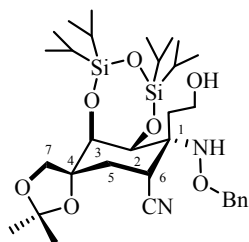


rac-(1*R*_N4*S*,5*R*,6*S*,7*R*,8*S*,9*S*)-
1-benciloxi-7-(benzoiloximetil)-
6-(*tert*-butildimetilsililo)-5,8,9-trihidroxi-
8,9-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-
1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona-5,7-carbolactona

Las estructuras **VIII**, se nombrarán como derivados ciclohexánicos y se numerarán de acuerdo a la numeración que se indica a continuación, aunque no sea según las reglas establecidas por la IUPAC.⁶ Así, la posición 1 será el carbono amínico, las posiciones 2 y 3 serán los carbonos que tienen sustituciones oxigenadas y la posición 7 será el carbono que se encuentra sobre el carbono 4.



VIII
ciclohexano



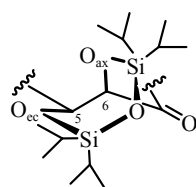
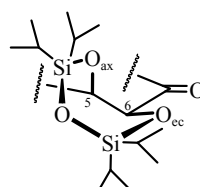
rac-(1*R*,2*S*,3*S*,4*S*,6*R*)-1-benciloxiamin-
6-ciano-1-etanol-2,3,4,7-tetrahidroxi-4-metil-
4,7-*O*-dimetoxipropano-
2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano

⁶ Como estructura base de las estructuras **VIII**, se ha escogido una base ciclohexánica, nombrando como sustituyentes los demás grupos funcionales, para dar generalidad a la nomenclatura de todos los compuestos con esta estructura base y también para relacionarlos de manera sencilla con la estructura ciclohexánica presente en la tetrodotoxina.

Teniendo en cuenta las orientaciones ecuatorial y axial de los oxígenos de sus respectivas posiciones C-5 y C-6, se proponen dos conformaciones mayoritarias para el anillo de trioxadisilepano que conforma el grupo protector TIPDS:

Una es un bote $^{O(5),Si-O(6)}B$ cuando la semisilla del anillo de ciclohexano es 5H_6 , el oxígeno que se encuentra sobre el carbono C-5 ocupa la posición axial y el oxígeno que se encuentra sobre el carbono C-6 ocupa la posición ecuatorial.

Otra es un bote $^{O(6),Si-O(5)}B$ cuando la semisilla del anillo de ciclohexano es 5H_6 , el oxígeno que se encuentra sobre el carbono C-5 ocupa la posición ecuatorial y el oxígeno que se encuentra sobre el carbono C-6 ocupa la posición axial.

Bote $^{O(5),Si-O(6)}B$ Bote $^{O(6),Si-O(5)}B$

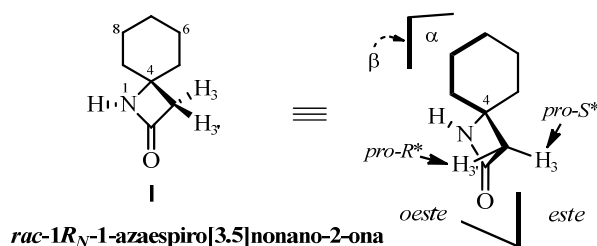
Mientras no se indique lo contrario, los productos quirales sintetizados en esta Memoria son racémicos (*rac*) y se representarán gráficamente mediante la figura de uno de sus enantiómeros.⁸

En la discusión de los datos espectroscópicos de 1H -RMN de la presente Memoria, se emplearán las siguientes claves:⁹ J_{AB} , para definir la constante de

⁸ Para los espirocompuestos sintetizados, estructuras **I**, **II** y **III** se propone, en base a los experimentos de Rayos-X realizados, una disposición espacial del nitrógeno N-1 de la β -lactama, que dispone el grupo -OR hacia ambos lados del plano definido por el anillo de β -lactama. Así, para cada compuesto se obtendrá un racémico del que únicamente se representará uno de sus enantiómeros. La configuración del nitrógeno N-1 de la β -lactama se determinó mediante las reglas de Cahn-Ingold-Prelog para heteroátomos y se indicará mediante $1R_N$ o $1S_N$. Ver: IUPAC Nomenclature Recommendations. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/> (consultado 13 de Enero de 2011).

acoplamiento entre los protones que constituyen un sistema *AB* (asignando la letra *A* al núcleo que resuena a campo más bajo); y J_w , para denominar a la constante de acoplamiento a larga distancia entre dos protones (4J), cuando los cuatro enlaces σ que los separan presentan una disposición en forma de *W*.

De forma general, en los derivados de 1-azaespiro[3.5]nonano-2-ona (estructuras **I**, **II**, **III** y **VII**) se designará como H-3 al protón del metileno β -lactámico (*pro-S**) situado a la derecha del plano definido por el anillo de 2-azetidinona cuando se observa la molécula por su cara α , es decir, orientando el nitrógeno N-1 por debajo del plano molecular, para el enantiómero representado gráficamente en cada caso. Consecuentemente, H-3' será el protón metilénico (*pro-R**) situado a la izquierda de dicho plano. De esta misma forma (H-número') se designarán los protones cuyo carbono se encuentre en el plano. Los protones que se encuentren paralelos al plano se designarán como H-número', mientras que los protones que cortan el plano se designarán como H-número.



Asimismo, se denominarán como partes *este* y *oeste* de las estructuras tipo 1-azaespiro[3.5]nonano-2-ona (**I**, **II**, **III** y **VII**) a aquellas situadas, respectivamente, a la derecha e izquierda del plano definido por el anillo β -lactámico cuando se observa la molécula por su cara α (opuesta al nitrógeno N-1).

⁹ De forma general, para las constantes de acoplamiento se utilizará la notación estándar $^nJ_{a,b}$ donde el superíndice (aunque no siempre se muestra) indica el número de enlaces que separan los dos protones y el subíndice indica los núcleos acoplados. Para señalar la disposición estereoquímica relativa de los protones acoplados, también se usarán las siguientes abreviaturas: J_{gem} ($^2J_{H-C-H}$), J_{anti} ($^3J_{H-C-C-H}$), J_{gauche} ($^3J_{H-C-C-H}$), J_{cis} ($^3J_{H-C=C-H}$) y J_{trans} ($^3J_{H-C=C-H}$).

La palabra inglesa *core* será utilizada para definir la estructura carbonada que presenta, con la disposición estereoquímica adecuada, los átomos de carbono y los grupos funcionales esenciales de la molécula objetivo de la síntesis. Así, consideraremos como *core* de la TTX a su esqueleto de ciclohexano altamente funcionalizado que incorpora, con la estereoquímica relativa apropiada, los carbonos C-9 y C-10 del puente carbonado del ortoéster, los carbonos convenientemente sustituidos C-4 y C-11, el nitrógeno que soporta el grupo guanidinio (N-1) y las posiciones oxigenadas C-5, C-6, C-7 y C-8.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Muchos de los medicamentos que actualmente están en el mercado farmacéutico contienen principios activos de origen naturales (Active Pharmaceutical Ingredient; API) como parte de su formulación. Estos APIs tienen, en general, un costoso y complicado proceso de obtención debido a los procesos de aislamiento y de purificación, con el añadido de ser recursos limitados, lo que conlleva un incremento de su precio.

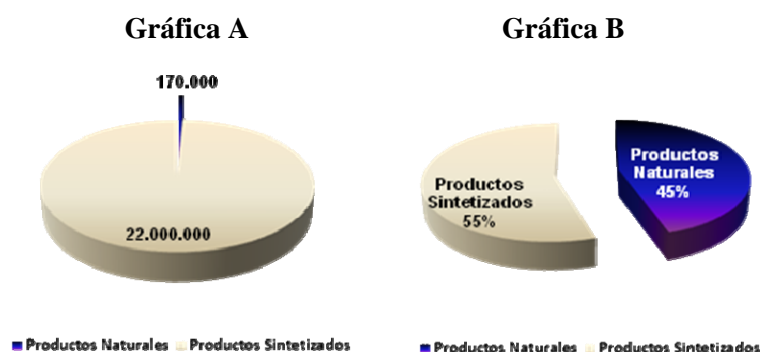


Figura 1. Gráfica A. Número de productos naturales (azul) y sintéticos (marmóleo) utilizados en la industria farmacéutica. Gráfica B. Beneficios generados por los productos naturales (azul) y sintéticos (marmóleo).

En la Figura 1, los gráficos A y B correspondientes al año 2007 muestran la proporción de productos naturales utilizados en el mercado para los fármacos (azul) respecto a los sintéticos (Figura 1, Gráfica A), y cómo esos pocos productos naturales proporcionan el 45% de los beneficios generados por ambos componentes (Figura 1, Gráfica B).¹

¹ L.Mueller-Kurth, "Successful, but often unconventional: The continued and long-term contribution of natural product healthcare" *Expert Opin. Drug Discov.*, **2007**, 2, 305-311.



I. FAMILIA DE LOS ALCALOIDES GUANIDÍNICOS

La tetrodotoxina (TTX, **1**) (Figura I.1) es un alcaloide guanidínico, molécula MbKDa² que posee un esqueleto altamente complejo y unas inusuales propiedades químicas.

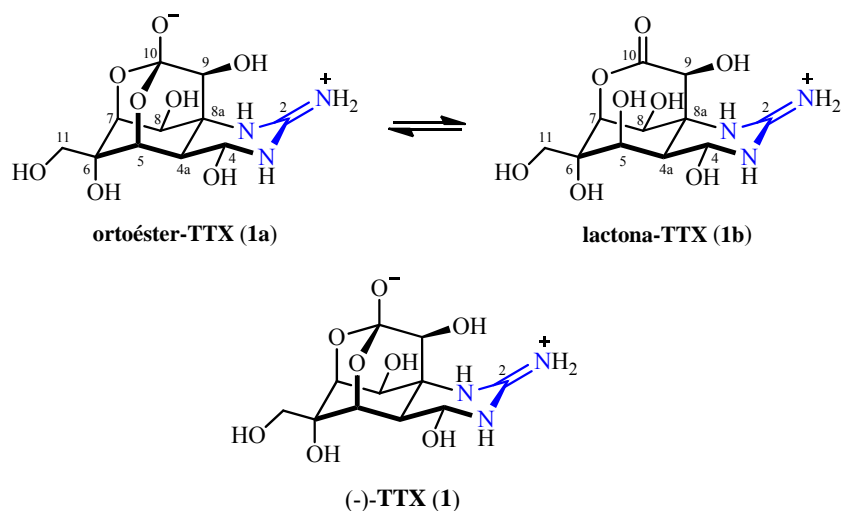


Figura I.1. Equilibrio tautómero entre las formas ortoéster-TTX (**1a**) y lactona-TTX (**1b**) de (-)-TTX (**1**). Estructura comúnmente empleada para representar la tetrodotoxina (**1**, TTX) (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

A pesar de ser asequible comercialmente a escala de miligramo y a elevados precios (Tabla I.1.), su uso terapéutico como analgésico para el tratamiento del dolor oncológico se está investigando activamente.³

² En la presente memoria se denomina MbKDa a aquella molécula cuyo peso molecular se encuentra por debajo del KiloDalton.

³ Wex Pharmaceuticals. Ver: http://www.wextech.ca/clinical_trials.asp?m=2&s=0&p=0

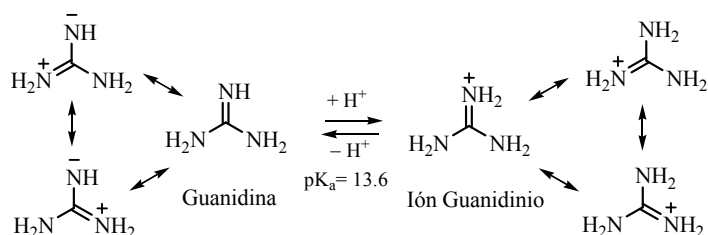
DISTRIBUIDOR	REFERENCIA	PUREZA	PRECIO
<i>Sigma-Aldrich</i>	T5651	En polvo	1 mg = 312.00 €
	T8024	HPLC (99%) en polvo	1 mg = 789.00 €
<i>Acros Organics</i>	256470010	Separat. Techn. HPLC ($\geq 99\%$)	1 mg = 289.00 €
	256470050		5 mg = 1122.20 €
<i>Tocris Bioscience</i>	1078	HPLC ($>98\%$)	1 mg = 166.00 €
	1069	Citrato ; HPLC ($>98\%$)	1 mg = 161.00 €

Tabla I.1. Empresas distribuidoras de tetrodotoxina (se muestran formatos y precios).

Los alcaloides guanidínicos constituyen una amplia familia de productos naturales nitrogenados caracterizados por contener uno o más grupos guanidínicos en su estructura.⁴ La guanidina es la imina de la urea ($pK_a = 13.6$). Su basicidad esta relacionada con la estabilización termodinámica por resonancia de su forma protonada, el ión guanidinio, que es 6-8 kcal/mol más estable que la propia guanidina (ambas especies presentan una conjugación Y debida a la deslocalización de seis electrones π , Esquema I.1).⁵

⁴ Para una revisión bibliográfica sobre productos naturales que contienen al menos un grupo guanidinio, ver: (a) Baran, P. S.; O'Malley, D. P.; Li, K.; Maue, M.; Zoógrafos, A. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4762-4775. (b) Berlinck, R.G.S.; Kossuga, M.H. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 516-550. (c) Berlinck, R.G.S. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 617-649. (d) Berlinck, R.G.S. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 339-365. (e) Berlinck, R.G.S. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *13*, 377-409. (f) Berlinck, R.G.S. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1995**, *66*, 119-295.

⁵ (a) Yamamoto, Y.; Kojima, S. en *The Chemistry of Amidines and Imidates*; Patai, S.; Rappoport, Z. Eds.; Wiley: New York, 1991; p. 485-526. (b) Sobre la basicidad de la guanidina, ver: Raczynska, E.D.; Cyranski, M.K.; Gutowski, M.; Rak, J.; Gal, J-F.; Maria, P-C.; Darowska, M.; Duczmal, K. *J. Phys. Org. Chem.* **2003**, *16*, 91-106. (c) Sobre la conjugación en Y de estructuras tipo guanidina e ion guanidinio, ver: Gobbi, A.; Frenking, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2362-2372. Gund, P. *J. Chem. Educ.* **1972**, *49*, 100-104.



Esquema I.1. Estabilización por resonancia de la guanidina y de su ion guanidinio en su equilibrio ácido base.

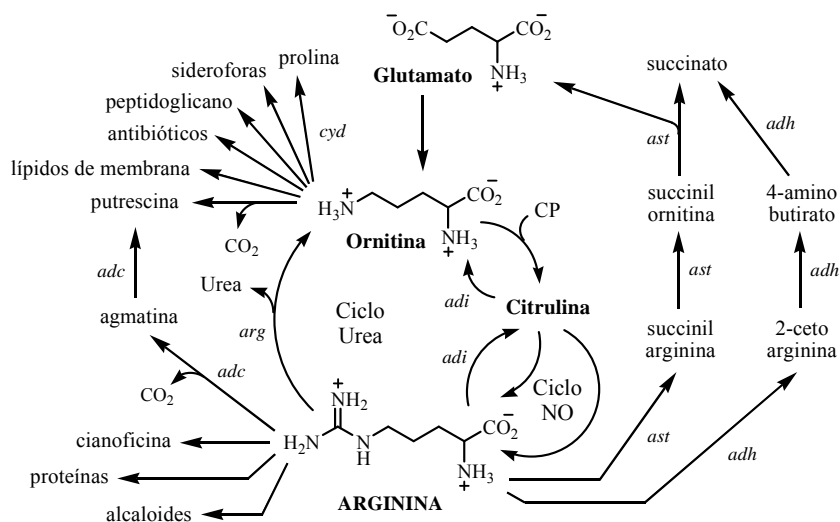
El grupo guanidinio forma parte de la estructura de muchos productos naturales de importancia biológica tales como guanina (base nitrogenada púrica presente en los ácidos nucleicos ADN y ARN), arginina (un aminoácido), creatina (intermedio implicado en síntesis de ATP en los músculos) y otros metabolitos secundarios. Sin embargo, la distribución de alcaloides guanidínicos de estructuras complejas entre los organismos vivos es limitada y han sido aislados de algunos microorganismos, algas, animales (invertebrados, peces y anfibios) y en menor medida plantas superiores, presentando estructuras y propiedades farmacológicas muy diversas.

Los alcaloides guanidínicos han sido clasificados mediante diferentes criterios, por ejemplo por su biosíntesis, por la presencia de ciclos en su estructura y por familias estructurales.

1.- **Por su biosíntesis**, según la procedencia de su función nitrogenada se clasifican en dos tipos:

a) **Procedentes de arginina**,⁶ aquellos que como fuente del grupo guanidinio utilizan un aminoácido de arginina e incorporan su esqueleto en la estructura del alcaloide (Esquema I.2).

⁶ Para biosíntesis y metabolismo de arginina, ver: (a) Glansdorff, N.; Xu, Y. en *Amino Acid Biosynthesis*; Wendisch, V.F. Ed; Springer: Berlin, 2007; pp. 219-257. (b) Cunin, R.; Glansdorff, N.; Piérard, A.; Stalon, V. *Microbiological Rev.* **1986**, 314-352.



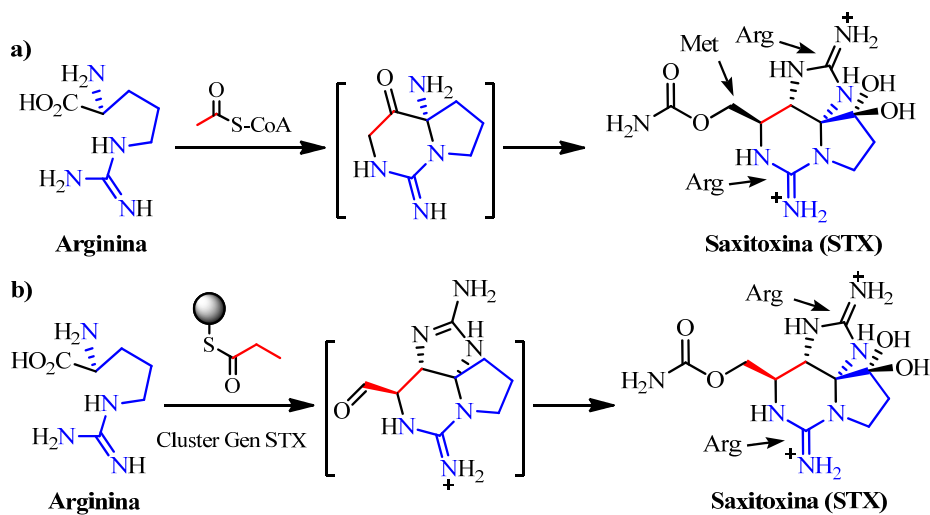
Clave: *adi* = ruta arginina desiminasa; *ast* = ruta arginina succinilasa; *adh* = ruta arginina oxidasa/deshidrogenasa/transaminasa; *arg* = ruta arginasa; *adc* = ruta arginina descarboxilasa; *cyd* = ornitina ciclodesaminasa; CP = carbamoilfosfato.

Esquema I.2. Representación esquemática de las principales interconexiones metabólicas de la biosíntesis de arginina (sólo se muestran los intermedios clave).

Como ejemplos de alcaloides derivados de la arginina se han propuesto las neurotoxinas STX⁷ y TTX⁸ (Esquema I.3).

⁷ Sobre la ruta biosintética de saxitoxina (STX), en la que sus dos agrupaciones guanidina polares provienen de arginina, ver: (a) Mihali, T. K.; Carmichael, W. W.; Neilan, B. A. *PLoS ONE* **2011**, 6, e14657; (b) Shimizu, Y. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 1685-1698; (c) Shimizu, Y. *Pure Appl. Chem.* **1986**, 58, 257-262.

⁸ (a) A pesar de no estar claro el origen biogénico de la TTX, se postula que su grupo guanidinio, igual que en el caso de la STX, procede de un precursor de arginina. Para una discusión general sobre la biosíntesis de la TTX, ver: Chau, R.; Kalaitzis, J. A.; Neilan, B. A. *Aquatic Toxicology* **2011**, 104, 61-72; Kotaki, Y.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 827-830. (b) En nuestro grupo de investigación, se ha propuesto una ruta biosintética alternativa para la TTX a través de la ruta del shikimato, siendo el ácido shikímico el precursor del anillo carbonado ciclohexánico de la tetrodotoxina.



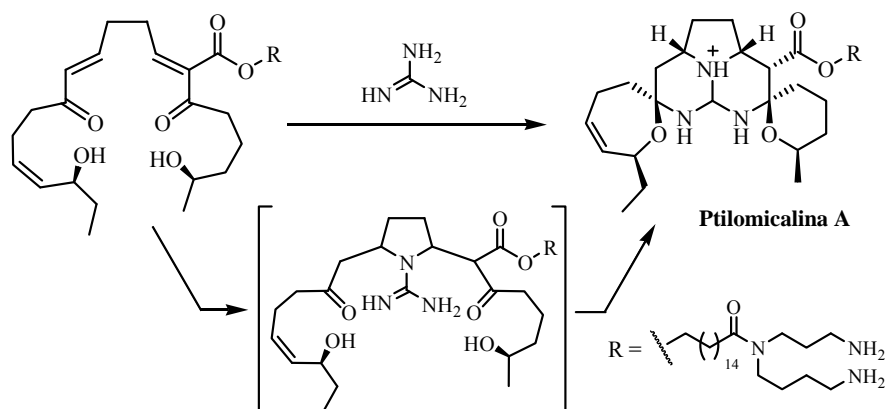
Clave: CoA = coenzima A. Arg = Arginina. Met = Metionina.

Esquema I.3. Ruta biosintética de saxitoxina (STX) propuesta por Shimizu y col. y Neilan y col., respectivamente.

b) *No procedentes de arginina*, aquellos en los que los átomos de nitrógeno de la guanidina se incorporan vía aminación de otro tipo de sustrato carbonado. Estos pueden ser derivados de acetato, shikimato, terpenos o esteroides. Por ejemplo, la ruta biosintética propuesta Snider y colaboradores⁹ para los alcaloides guanidínicos policíclicos aislados de algunas especies de esponjas marinas, entre los que se incluyen la ptilomicalina A, crambescidinas, crambescinas, ptilocaulinas, mirabilinas y batzelladinas (todos ellos relacionados biogenéticamente, Figura I.5), implica una doble adición conjugada de guanidina a una cadena de policétido (bis-enona) convenientemente funcionalizada (Esquema I.4).¹⁰

⁹ Sobre la biosíntesis de ptilomicalina A propuesta por Snider y col., extrapolable al resto de derivados de crambescidina, ver: Snider, B.B.; Shi, Z. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2526-2528.

¹⁰ En nuestro grupo de investigación, se está desarrollando la síntesis de ptilomicalinas, crambescidinas y otros compuestos relacionados, ver: (a) Delgado, J.; Noheda, P.; Pérez, R.; Cadenas, M. L.; Pinto, F. M.; Jimeno, M. L.; Fort, D.; Pérez, N.; Blanco, D.; Herrero, D.;



Esquema I.4. Ruta biosintética de ptilomicalina A propuesta por Snider y col.

2.- *Por la presencia de ciclos en su estructura*, se pueden clasificar en dos grandes grupos:

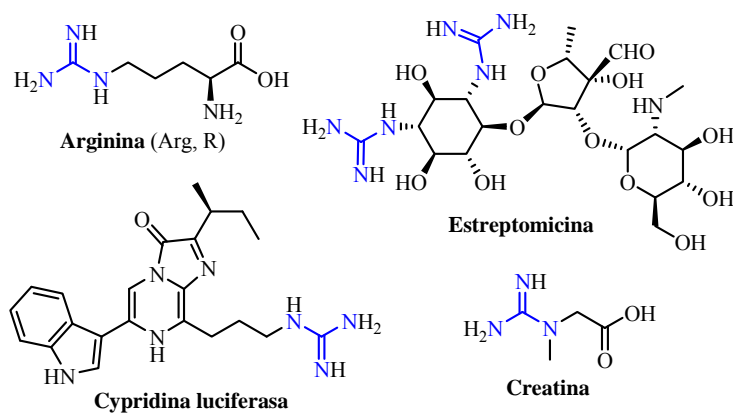


Figura I.2. Ejemplos de derivados guanidínicos *acíclicos*
(se destaca en color azul la agrupación guanidina).

Gallardo, M. Compuestos Marinos Antagonistas de los Canales de Calcio para el Tratamiento de Enfermedades Cardiovasculares. PCT/ES2011/070761; (b) Delgado, J.; Noheda, P.; Pérez, R.; Cadenas, M. L.; Pinto, F. M.; Jimeno, M. L.; Fort, D.; Pérez, N.; Blanco, D.; Herrero, D.; Gallardo, M. Procedimiento de Síntesis de Intermedios de Crambescidinas, de Cimipronidina y de sus Derivados. ES201031743.

a) **acíclicos**, aquellos en los que la guanidina es un sustituyente de una cadena principal lineal, ramificada o cíclica. Algunos ejemplos son arginina, estreptomicina, cypridina luciferasa y creatina (Figura I.2).

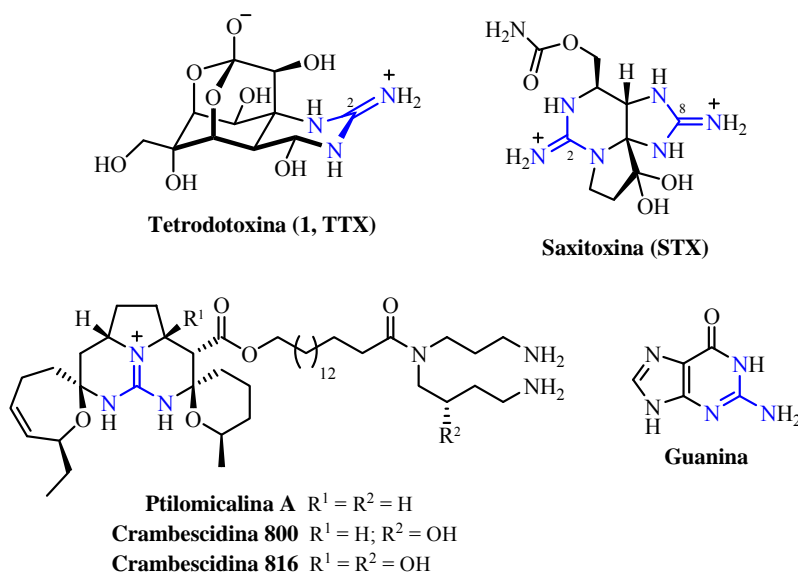


Figura I.3. Ejemplos de derivados guanidínicos *cíclicos*
 (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

b) **cíclicos**, aquellos en los que el grupo guanidinio forma parte de un heterociclo. Algunos ejemplos son tetrodotoxina (TTX, **1**), saxitoxina (STX) y crambescidinas¹¹, ptilomicalina y guanina (Figura I.3).

3.- **Por familias estructurales** se pueden clasificar en:

a) **Las caracasanamidas**¹². Algunos ejemplos son la galegina (caracasanamida G7), aislada primero de la *Verbena enceloides* y después

¹¹ Sobre el aislamiento y síntesis de ptilomicalinas, crambescidinas y otros compuestos relacionados, ver: (a) Aron, Z.D.; Overman, L.E. *Chem. Commun.* **2004**, 253-265. (b) Nagasawa, K.; Hashimoto, Y. *Chem. Rec.* **2003**, 3, 201-211. (c) Heys, L.; Moore, C.G.; Murphy, P.J. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 57-67. (d) Coffey, D.S.; McDonald, A.I.; Overman, L.E.; Rabinowitz, M.H.; Renhowe, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4893-4903.

identificada como el componente tóxico en la *Galega officinalis*. La galegina proporciona la estructura base para la síntesis de la metformina y se utiliza para la síntesis de otro tipo de biguanidínicos usados como medicamentos antidiabéticos (Glaformil® comercializado por Merck Serono, Efficib® comercializado por Almirall S.A., Janumet® comercializado por Merck Sharp & Dohme).

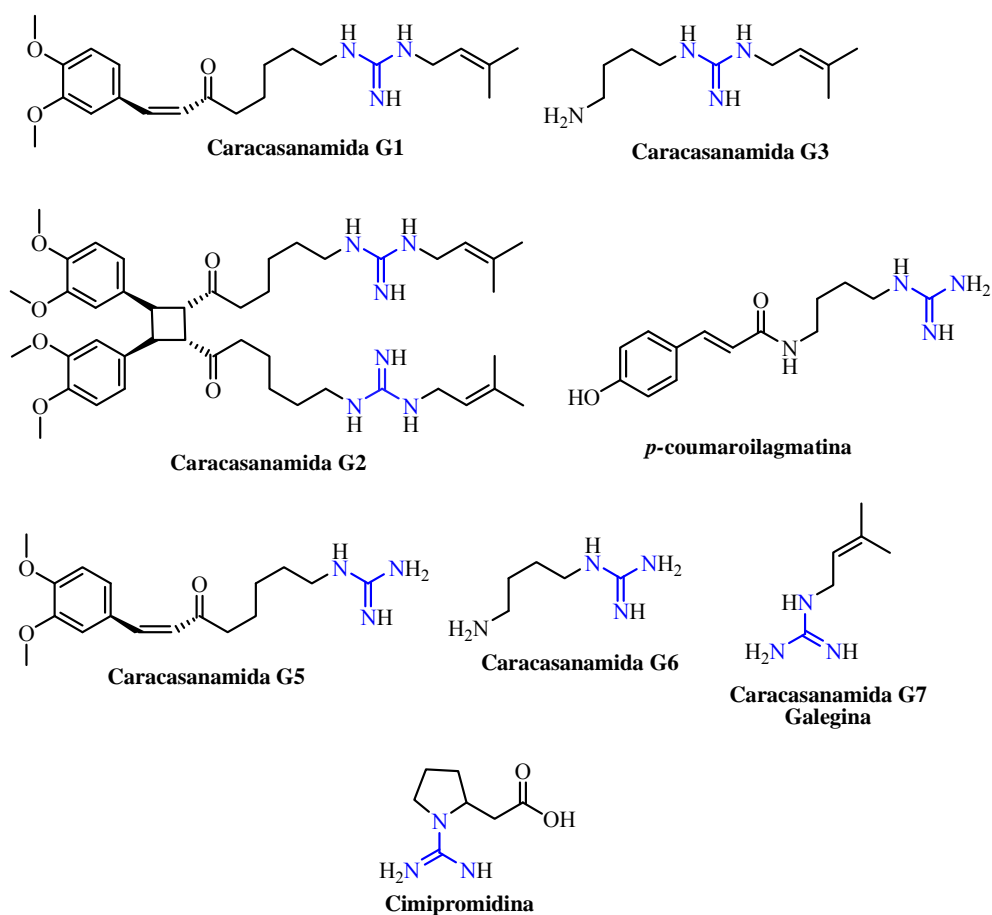


Figura I.4. Ejemplos de derivados guanidínicos relacionados con las caracasanamidas (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

¹² Fabricant, D. S.; Nikolic, D.; Lankin, D. C.; Chen, S.; Jaki, B. U.; Krunic, A.; van Breemen, R. B.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Pauli, G. F. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1266-1270.

Las caracasanamidas G1, G3, G6 y G7 fueron aisladas de extractos de la *Verbesina caracasana* y todas ellas bajan la presión sanguínea en ratas. La caracasanamida G2, dímero de G1, es la que más disminuye la presión sanguínea.

b) **Las Crambescidinas y Ptilomicalinas.** La Ptilomicalina A fue la primera de este grupo que se aisló de las esponjas *Ptilocaulis spiculifer* y *Hemimyscale spiculifer*. Las crambescidinas 800 y 816, se aislaron de la especie *Crambe crambe* (Figura I.5).

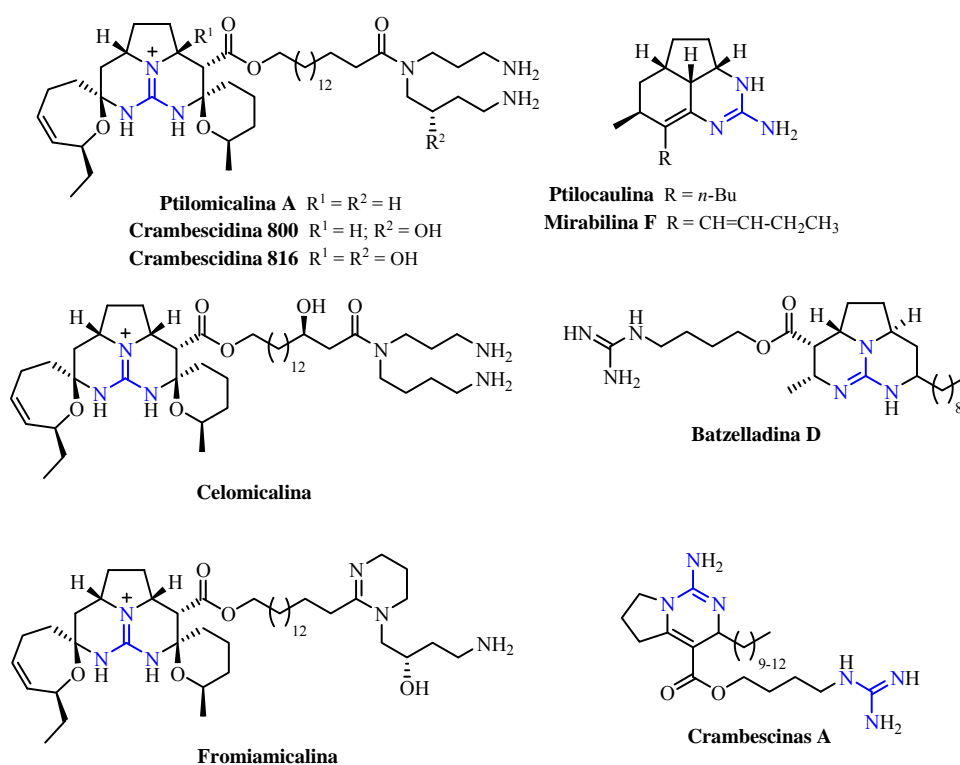


Figura I.5. Ejemplos de derivados guanidínicos relacionados con las crambescidinas y ptilomicalinas (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

La estructura de estos alcaloides presentan una guanidina tricíclica central (cuya fusión *cis* entre los anillos le da forma de “vaso”) conectada a una unidad de espermidina a través de un ácido graso de cadena larga lineal (ω -hidroxiácido) empleado como separador. Suelen exhibir una amplia actividad biológica, pudiendo ser utilizados como antitumorales, antivirales, antifúngicos o inhibidores de las bombas de iones Na^+/K^+ y Ca^{2+} . Algunos ejemplos de esta familia son ptilomicalina, mirabilina F, celomicalina, batzelladina D, fromiamicalina y crambescidinas A (Figura I.5).¹³

Algunos ejemplos de esta familia son la neosaxitoxina (neoSTX)¹⁴, las gonyauntoxinas (GTX)¹⁵ y la zetekitoxina AB¹⁶ (Figura I.6).

c) **La oroidina:** Familia de alcaloides guandínicos marinos compleja y diversa, bioactiva en metabolitos secundarios. En esta familia se encuentran, entre otros, la dibromophakellin,¹⁷ la bromophakellin y la amina de Palau¹⁸ (Figura I.8).

¹³ Sobre el aislamiento y síntesis de ptilomicalinas, crambescidinas y otros compuestos relacionados, ver: (a) Aron, Z.D.; Overman, L.E. *Chem. Commun.* **2004**, 253-265. (b) Nagasawa, K.; Hashimoto, Y. *Chem. Rec.* **2003**, 3, 201-211. (c) Heys, L.; Moore, C.G.; Murphy, P.J. *Chem. Soc. Rev.* **2000**, 29, 57-67. (d) Coffey, D.S.; McDonald, A.I.; Overman, L.E.; Rabinowitz, M.H.; Renhowe, P.A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 4893-4903.

¹³ Fabricant, D. S.; Nikolic, D.; Lankin, D. C.; Chen, S.; Jaki, B. U.; Krunic, A.; van Breemen, R. B.; Fong, H. H. S.; Farnsworth, N. R.; Pauli, G. F. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1266-1270.

¹⁴ Rodríguez-Navarro, A. J.; Lagos, N.; Lagos, M.; Braghetto, I.; Csédes, A.; Hamilton, J.; Figueroa, C.; Truan, D.; García, C.; Rojas, A.; Iglesias, V.; Bruan, L.; Alvarez, F. *Anesthesiology*. **2007**, 106, 339-345.

¹⁵ (a) Osamu Iwamoto, O.; Nagasawa, K. *Org. Lett.* **2010**, 12, 2150-2153. (b) Du Bois, J.; Malcahy, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12630-12631. (c) Miao, Y. P.; Chen, Y. M.; Zhou, H. N.; Wen, R. *J. Chinese Pharm. Sci.* **2004**, 13, 103-105.

¹⁶ Yotsu-Yamashita, M.; Kim Y. H.; Doudley, S. C.; Choudhary, G.; Pfahnl, A.; Oshima, Y.; Daly, J. W. *PNAS*. **2004**, 101, 4346-6351.

¹⁷ Romo, D.; Poullennec, K. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6344-6345.

¹⁸ (a) Seiple, I. B.; Su, S.; Young, I. S.; Nakamura, A.; Yamaguchi, J. Jørgensen, L.; Rodríguez, R. A. O'Malley, D. P.; Gaich, T.; Köck, M.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14710-14726. (b) Baran, P. S.; Seiple, I. A.; Su, S.; Young, I. S.; Lewis, C. A.; Yamaguchi, J. *Angew. Chem.* **2010**, 132, 1113-1116.

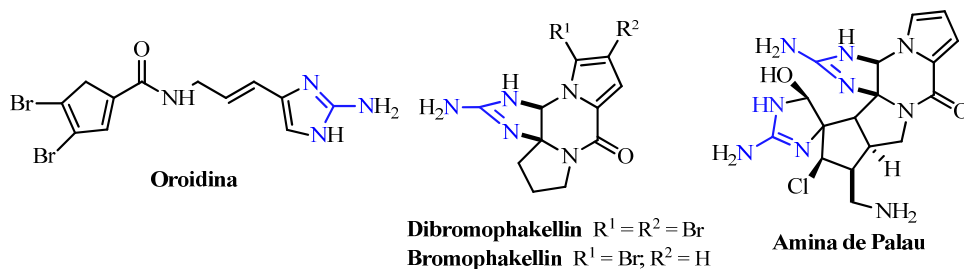


Figura I.8. Ejemplos de derivados guanidínicos relacionados con la oroidina (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

d) **La massadina:** Los compuestos relacionados con la familia de la massadina poseen una potente actividad fungicida contra el hongo *Candida Albicans* a través de la inhibición de la geranilgeraniltransferasa 1 (GGTasa 1).

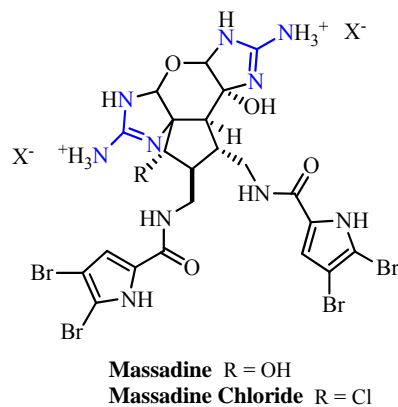


Figura I.9. Estructura de los compuestos de la familia de la massadina.

Además, presenta una notable actividad biológica inmunosupresora, citotóxica y antiinflamatoria. En esta familia, se encuentran la massadina y la cloromassadina (Figura I.9).¹⁹

¹⁹ (a) Seiple, I. B.; Su, S.; Young, I. S.; Nakamura, A.; Yamaguchi, J. Jørgensen, L.; Rodríguez, R. A. O'Malley, D. P.; Gaich, T.; Köck, M.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14710-14726. (b) Su, S.; Seiple, I. B.; Young, I. S.; Baran, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**,

e) **La saxitoxina**: La saxitoxina (STX), una neurotoxina aislada inicialmente de la almeja *Saxidomus giganteus*, se ha encontrado en numerosas especies de crustáceos (especialmente bivalvos) que se alimentan de los verdaderos productores de la toxina, ciertas microalgas *Dinoflagellatas* (extenso grupo de protistas flagelados, mayoritariamente especies unicelulares, que forman parte del placton marino).

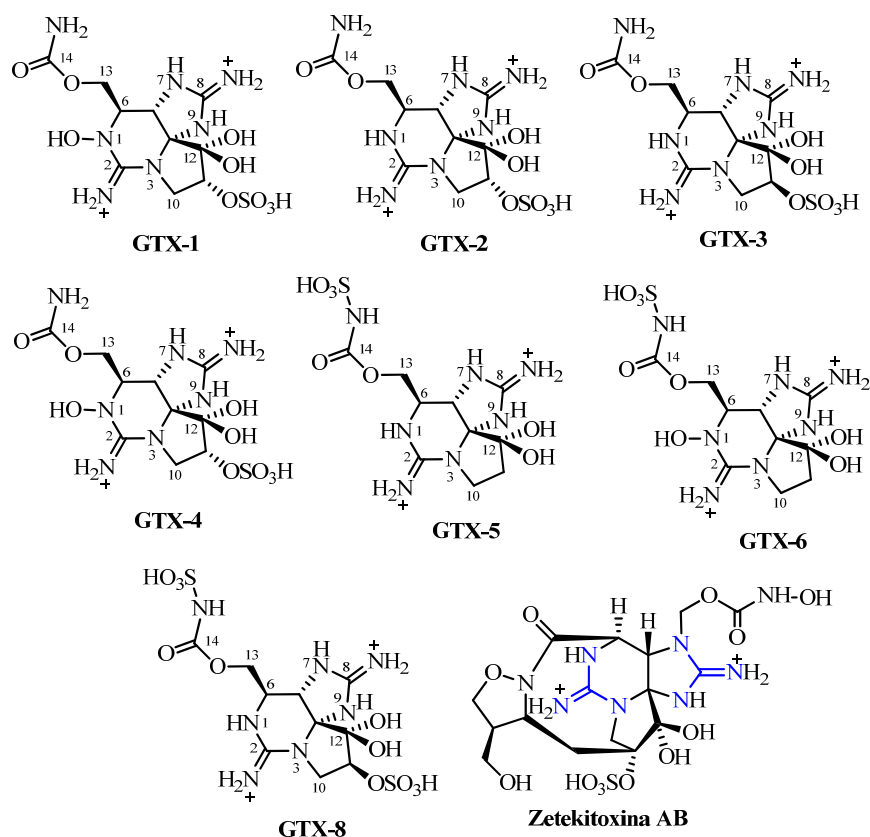


Figura I.6. Ejemplos de derivados guanidínicos relacionados con las saxitoxina (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

130, 16490-16491. (c) Sivappa, R.; Hernández, N. M.; He, Y.; Lovely, C. J. *Org. Lett.* **2007**, 9, 3861-3864

Algunas de estas especies son la dinoflagelada *Gonyaulax*, en zonas marinas, o la cianobacteria *Aphanizomenon*, en agua dulce.²⁰

f) **La tetrodotoxina:** La tetrodotoxina (TTX) es una toxina aislada en 1909 de los ovarios de un pez globo del orden *Tetraodontidae*.²¹ En este se encuentran, entre otros, la 11-norTTX-(6*S*)-ol, la 11-nor-TTX-(6*R*)-ol y la chiriquitoxina. (Figura I.7).

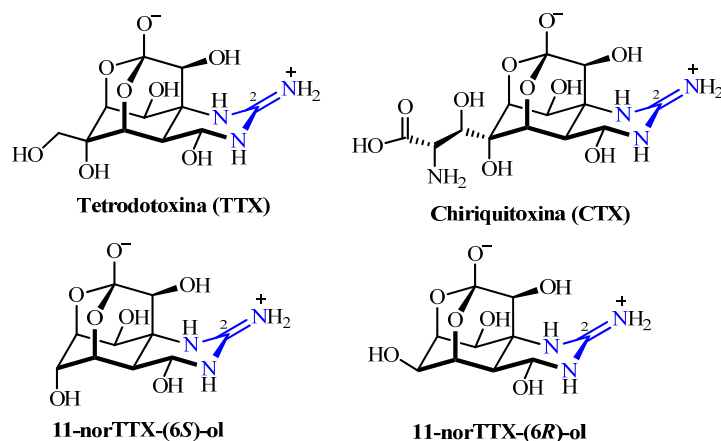


Figura I.7. Ejemplos de derivados guanidínicos relacionados con la tetrodotoxina (se destaca en color azul la agrupación guanidina).

II. TETRODOTOXINA

A. AISLAMIENTO DE TETRODOTOXINA (TTX)

La TTX fue aislada por primera vez en 1909 de los ovarios de un pez globo del orden *Tetraodontidae*.²² Se ha detectado TTX o alguno de sus análogos en los

²⁰ Kodama, M.; Ogata, T.; Sato, S. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, 52, 1075-1077.

²¹ (a) Tahara, Y. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1909**, 29, 587-625. *íd. Biochem. Z.* **1911**, 30, 255-275. (b) Para una breve perspectiva histórica sobre el aislamiento de TTX, ver: Fuhrman, F.A. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, 479, 1-14.

²² (a) Tahara, Y. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **1909**, 29, 587-625; Tahara, Y. *Biochem. Z.* **1911**, 30, 255-275. (b) Para una breve perspectiva histórica sobre el aislamiento de TTX, ver: Fuhrman, F. A.

tejidos de peces globo de los géneros: *Tetraodon* (*T. fahaka*, *T. miurus* y *T. mbu*), *Fugu* (*F. flavidus*, *F. poecilonotus*, y *F. niphobles*), *Arothron* (*A. nigropunctatus*), *Chelonodon spp.*,²³ y *Takifugu* (*T. rubripes*).²⁴ Además, la TTX también ha sido aislada de una variada gama de organismos, tanto acuáticos²⁵ como terrestres.^{26,27} Además, existe toda una serie de estudios ecológicos de la TTX basados en sistemas predadores depredadores.²⁸

Las especies de bacterias de los géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Pasteurella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Flavobacterium* son productoras de TTX.²⁹ Sin embargo, hasta la fecha, no se ha

Ann. N.Y. Acad. Sci. **1986**, 479, 1-14. (c) Para nuevos métodos de aislamiento y purificación de tetrodotoxina, ver: Zhou, M.; Shum, F. H. K. System for Extracting Tetrodotoxin. US 6,478,966 B2, 12/11/2002.

²³ Según la nomenclatura binomial biológica (taxonómica) de los organismos vivos, la abreviatura *spp.* se utiliza para denotar todas las especies de un taxón superior, mientras que *sp.* hace referencia a una única especie de un género determinado.

²⁴ Para unas revisiones bibliográficas sobre la distribución y origen biológico de TTX, ver: (a) Miyazawa, K.; Noguchi, T. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2001**, 20, 11-33; y referencias citadas. (b) Yasumoto, T.; Nagai, H.; Yasumura, D.; Michishita, T.; Endo, A.; Yotsu, M.; Kotaki, Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, 479, 44-51.

²⁵ Peces (*Yongeichthys sp.*), cefalópodos como el pulpo anillado de puntos azules (*Hapaloclaena maculosa*), equinodermos (*Astropecten sp.*), gastrópodos (*Nassarius spp.* y *Charonia spp.*) crustáceos (*Eriphia spp.* y *Carcinoscorpius spp.*), gusanos marinos (*Planocera spp.* y *Lineus spp.*) y algunas algas (*Jania spp.*) y dinoflagelatas.

²⁶ Anfibios como salamandras (*Taricha spp.* y *Tariturus spp.*) y ranas (*Atelopus spp.* y *Brachycephalus spp.*).

²⁷ La amplia distribución de TTX en organismos tan distintos, junto con las variaciones en la concentración de la toxina encontradas según el individuo, región y estación del año, han llevado a proponer el origen bacteriano exógeno de la TTX. En este sentido, un cierto tipo de bacterias serían las responsables de la producción de TTX y después ésta se acumularía en los animales, bien por que la incorporen eventualmente en la dieta (vía cadena trófica), o bien actúen como anfitriones de dichos microorganismos de manera simbiótica, ver: Daly, J.W. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 1211-1215.

²⁸ Bao, B.; Yang, G.; Xu, J.; Liang, S.; Ren, D.; Yan, X. *Toxicon* **2010**, 56, 324-329. (b) Fujimoto, E.; Geffeney, S. L.; Brodie III, E. D.; Brodie Jr, E. D.; Ruben, P. C. *Nature* **2005**, 434, 759-763. (c) Hanifin, C. T.; Brodie Jr. E. D.; Brodie III, E. D. *PLoS Biology*, **2008**, 6, 471-482. (d) Groos, L. *PLoS Biology*, **2008**, 6, 419-420.

²⁹ Distintas especies de bacterias productoras de TTX (1) identificadas, ver: (a) Matsumura, K. *Appl. Env. Microbiol.* **1995**, 61, 3468-3470. (b) Yasumura, D.; Yotsu, M.; Michishita, T.; Endo, A.; Kotaki, Y. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, 50, 793-795. (c) Noguchi, T.; Jeon, J-K.;

conseguido obtener TTX de origen bacteriano en el laboratorio de forma continuada.³⁰

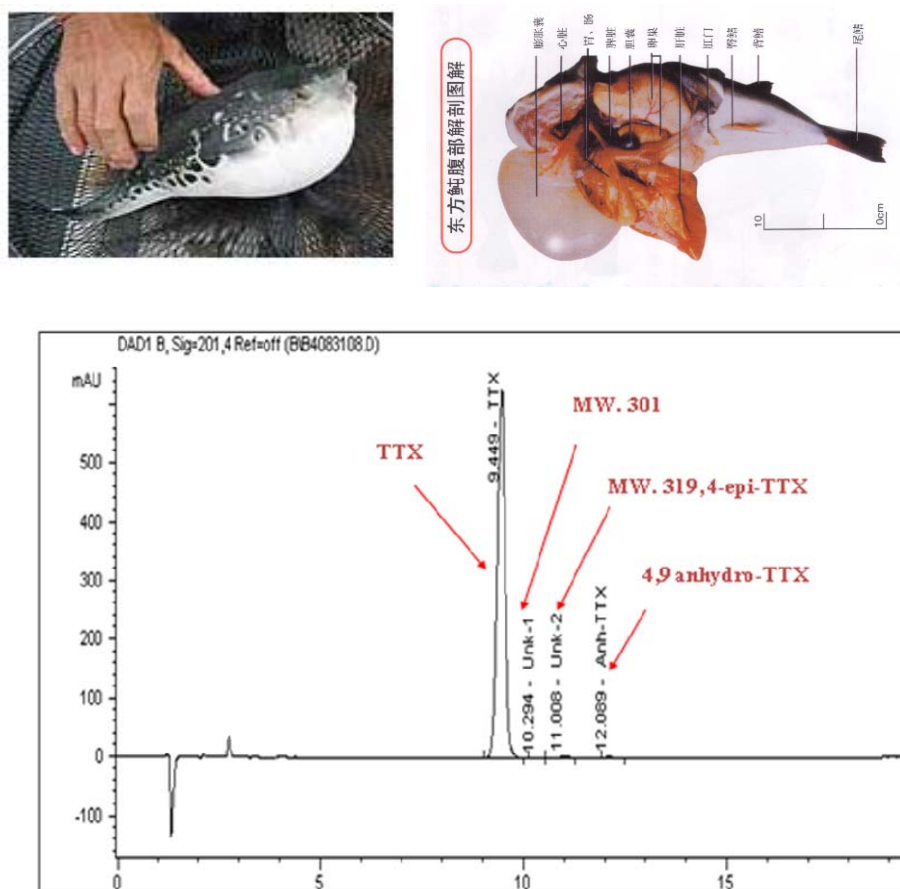


Figura II.1. Pez globo y disección para la extracción de la TTX de sus ovarios.

Arakawa, O.; Sugita, H.; Deguchi, Y.; Shida, Y.; Hashimoto, K. *J. Biochem.* **1986**, 99, 311-314. (d) Referencias citadas en Ref. 24a.

³⁰ Dos evidencias apoyan la hipótesis del origen bacteriano de la TTX: a) se han encontrado bacterias productoras de TTX en algunos de los animales que contienen la toxina; y b) se ha observado que los peces globo de acuicultura no presentan TTX, pero la acumulan cuando son alimentados con restos de peces globo productores de TTX.

La TTX cristalina no se disuelve en disolventes orgánicos neutros, tal como acetona o DMSO,³¹ es insoluble en agua y muy soluble en ácidos diluidos.³²

Para la obtención de 1 Kg de TTX, requisito de la FDA para su uso farmacéutico, desde fuente natural, son necesarios aproximadamente 2.000 toneladas de peces globos, 50 toneladas de ovarios de peces globo, lo que equivale aproximadamente a unos dos millones de peces con un precio estimado (extracción y pesca) de 110 millones de euros y un precio de mercado de 789 millones de euros (TTX en polvo con pureza HPLC 99%). (Figura II.1).

B. ESTRUCTURA DE TETRODOTOXINA (TTX)

Pasados 55 años de su aislamiento, en 1964, los grupos de investigación de Goto,³³ Tsuda³⁴ y Woodward³⁵ propusieron de forma independiente la misma estructura para la TTX.³⁶ Esta molécula presenta un equilibrio tautomérico entre las formas ortoéster-TTX (**1a**) y lactona-TTX (**1b**) de la TTX (**1**). (Esquema I.4).

³¹ Cuando la TTX se encuentra como un sólido amorfo es parcialmente soluble en DMSO.

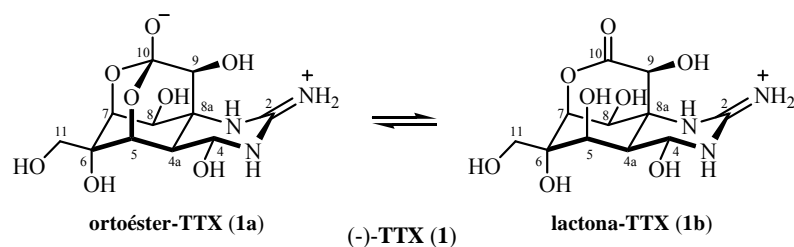
³² Las particulares características físico-químicas de la TTX (**1**), imponen fuertes limitaciones en la metodología utilizada para su modificación química y el aislamiento de los productos de reacción. Normalmente, su aislamiento requiere el uso de disoluciones tampón y liofilización.

³³ Goto, T.; Kishi, Y.; Takahashi, S.; Hirata, Y. *Tetrahedron* **1965**, *21*, 2059-2088.

³⁴ Tsuda, K.; Ikuma, S.; Kawamura, M.; Tachikawa, R.; Sakai, K.; Tamura, C.; Amakasu, O. *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1964**, *12*, 1357-1374.

³⁵ Woodward, R.B. *Pure. Appl. Chem.* **1964**, *9*, 49-74.

³⁶ También en 1964, el grupo de Mosher publica la determinación estructural de la TTX (C₁₁H₁₇N₃O₈) refiriéndose a ella, originalmente, con el nombre de tarichatoxina (toxina aislada de algunas salamandras del género *Taricha*), ver: Mosher, H.S; Fuhrman, F.A.; Buchwald, H.D.; Fischer, H.G. *Science* **1964**, *144*, 1100-1110.



Esquema II.1. Equilibrio tautomérico entre las formas ortoéster-TTX (**1a**) y lactona-TTX (**1b**) de (-)-TTX (**1**).

La estereoquímica absoluta de la (-)-TTX natural ((-)-**1**) fue determinada inequívocamente por el análisis cristalográfico de difracción de rayos X de uno de sus análogos.^{37,38}

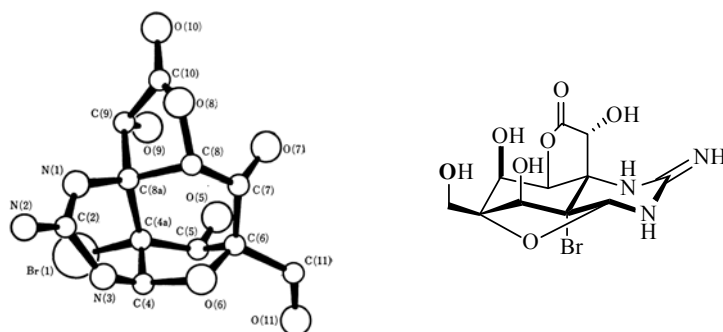


Figura II.2. Estructura de determinada por rayos X de un derivado de la TTX por Furusaki y col.

El grupo guanidinio tiene un pK_a de 11.6 y siempre se encuentra protonado a pH fisiológico (estando estabilizado por resonancia, *vide supra*). Por

³⁷ La estructura de (-)-TTX (**1**) fue confirmada por difracción de rayos-X de su hidrobromuro derivado, ver: Furusaki, A.; Tomiie, Y.; Nitta, I. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 3325-3331.

³⁸ Para el estudio cristalográfico de otros derivados de TTX, ver: (a) Tsuda, K.; Tamura, C.; Tachikawa, R.; Sakai, K.; Amakasu, O.; Kawamura, M.; Ikuma, S. *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1964**, *12*, 643-645. (b) *ibid.* **1963**, *11*, 1473-1475. (c) Tomiie, Y.; Furusaki, A.; Kasami, K.; Yasuoka, N.; Miyake, K.; Haisa, M.; Nitta, I. *Tetrahedron Lett.* **1963**, 2101-2104. (d) Ref. 22.

su parte, el anión del hemilactal ácido de C-10 (ortoéster-TTX, **1a**), con un pK_a de 8.7, coexiste con su forma protonada.

La estructura del ortoéster-TTX (**1a**), la única que forma parte de la estructura cristalina de TTX (**1**), se caracteriza por poseer (Esquema II.1): a) un esqueleto de dioxadamantano funcionalizado por grupos hidroxilo sobre los carbonos C-6, C-8 y C-9, y un hidroximetilo sobre C-6; b) una guanidina (C-2) que participa en la formación de un hemiaminal cíclico (C-4); y c) un ortoéster (C-10) cuya acidez ($pK_a = 8.7$) permite la formación de un *zwitterion* con la guanidina.

Dicha estructura del ortoéster-TTX (**1a**) contiene ocho centros estereogénicos contiguos, dos de ellos tetrasustituídos, C-6 y C-8a, además de otros dos carbonos cuaternarios en las posiciones C-2 y C-10. También, cabe destacar como se concentra toda la sustitución del anillo de ciclohexano por la cara α de la molécula,³⁹ a excepción de los centros cuaternarios C-6 y C-8a que disponen un oxígeno y un nitrógeno, respectivamente, por la cara contraria.

La estructura de la lactona-TTX (**1b**) se caracteriza por poseer (Esquema II.1): a) un esqueleto triciclo funcionalizado por grupos hidroxilo sobre los carbonos C-4, C-5, C-6, C-8 y C-9, y un hidroximetilo sobre C-6; b) una guanidina (C-2) que participa en la formación de un hemiaminal cíclico (C-4); y c) una lactona ((C-7)-O(C-10)=O).

Dicha estructura de la lactona-TTX (**1b**) contiene siete centros estereogénicos contiguos, dos de ellos tetrasustituídos, C-6 y C-8a, además de otros dos carbonos cuaternarios en las posiciones C-2 y C-10.

³⁹ De acuerdo a lo asignado en el apartado de *Nomenclatura* se denominará cara α de la molécula de TTX (**1**) a aquella por la cual se encuentra situado su nitrógeno N-1.

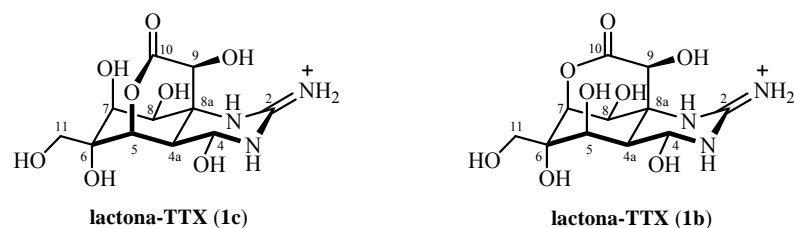
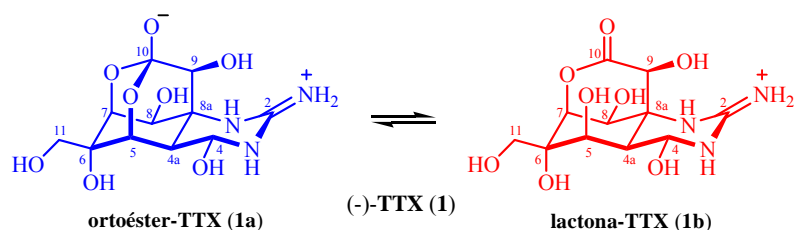


Figura II.3. Estructuras de las dos posibles lactonas que podrían formar parte de la TTX

Sólo se observa la lactona-TTX (**1b**) por ser la más estable al disponer del hidroxilo de (C-9) en la configuración *S*. (Figura II.3).

La complejidad de su espectro de RMN de la tetrodotoxina (TTX, **1**) (Figura II.4) se asocia al equilibrio tautomérico entre sus formas ortoéster-TTX (**1a**) y lactona-TTX (**1b**).⁴⁰



⁴⁰ (a) Habitualmente, los espectros de RMN de TTX (**1**) y sus análogos se registran a temperatura ambiente (25 °C) empleando CD₃CO₂D al 4% en D₂O como disolvente. Además, la adición del 1% CF₃COOD a dicho disolvente mejora la resolución de las señales de ¹H-RMN de las muestras. (b) Sobre las metodologías utilizadas en la detección y caracterización de TTX, ver: Noguchi, T.; Mahmud, Y. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2001**, 20, 35-50.

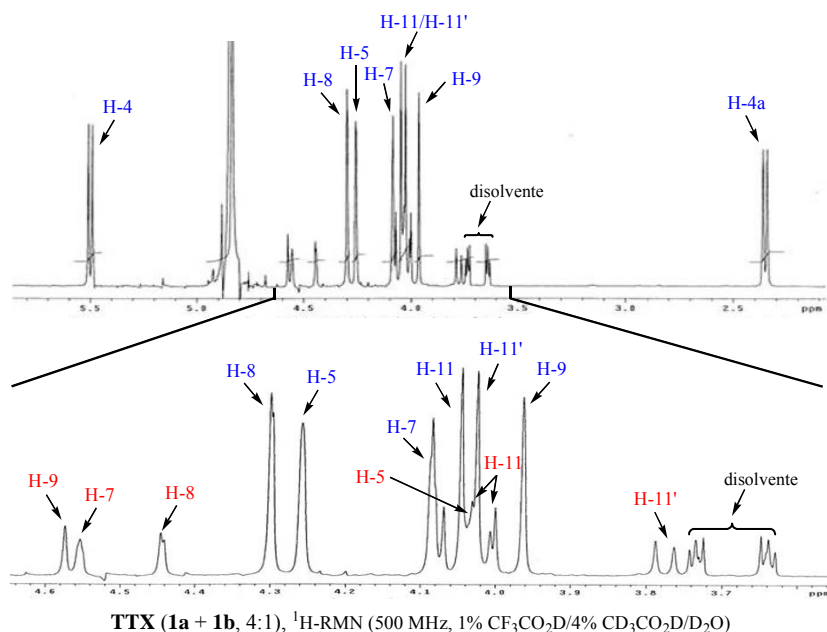
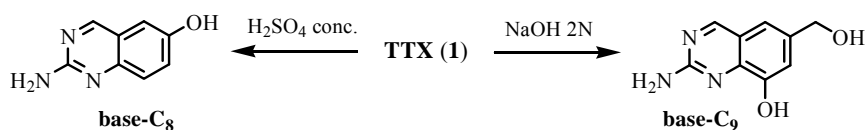


Figura II.4. Espectro de ¹H-RMN de TTX (**1**) asociado a la existencia del equilibrio tautomérico entre sus formas ortoéster (**1a**, en color azul) y lactona (**1b**, en color rojo).⁴¹

La TTX (**1**) en estado sólido es indefinidamente estable (P.f. = 220 °C), en disolución sólo es estable a pH neutro y en ácidos diluidos, descomponiendo a niveles de pH superiores a 8.5 o inferiores a 3.⁴²

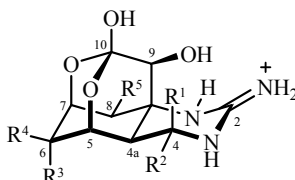
⁴¹ La proporción de entre los tautómeros de TTX **1a** (ortoéster) y **1b** (lactona) es variable (de [4:1] a [10:1], respectivamente) y depende del pH de la disolución ácida acuosa.

⁴² La degradación de TTX (**1**) en condiciones básicas o ácidas drásticas conduce a los derivados de quinazolina conocidos como base-C₉ y base-C₈, respectivamente. Ver: (a) Goto, T.; Kishi, Y.; Hirata, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1962**, *35*, 1045-1046. (b) *ibíd.* 1244-1245. (c) Nachman, R. J. *Synthetic Approaches to Tetrodotoxin and Analogs*. Tesis Doctoral, Universidad de Stanford, 1981.



C. ANÁLOGOS NATURALES DE TTX

Han sido identificados y aislados de distintas fuentes naturales unas decenas de análogos de TTX (**1**) que presentan variaciones en la sustitución o estereoquímica de las posiciones C-4, C-5, C-6, C-9 y/o C-11.⁴³ De manera general, estos derivados se pueden agrupar en estructuras de tipo: ortoéster (Tabla II.1), lactona (Tabla II.2) y 4,9-anhidro (Tabla II.3).



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
TTX (1a)	H	OH	OH	CH ₂ OH	OH
4-<i>epi</i>-TTX	OH	H	OH	CH ₂ OH	OH
6-<i>epi</i>-TTX (a)	H	OH	CH ₂ OH	OH	OH
11-desoxi-TTX (b)	H	OH	OH	CH ₃	OH
4-<i>epi</i>-11-desoxi-TTX	OH	H	OH	CH ₃	OH
TTX-8-<i>O</i>-hemisuccinato	H	OH	OH	CH ₂ OH	O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ ⁻
chiriquitoxina (CTX)	H	OH	OH	^(R) CH(OH) ^(S) CH(NH ₃ ⁺)CO ₂ ⁻	OH
11-nor-TTX-6(<i>S</i>)-ol (c)	H	OH	OH	H	OH
11-nor-TTX-6(<i>R</i>)-ol (d)	H	OH	H	OH	OH
11-nor-TTX-6,6-diol	H	OH	OH	OH	OH
11-oxo-TTX	H	OH	OH	CH(OH) ₂	OH
ác. TTX-11-carboxílico	H	OH	OH	CO ₂ ⁻	OH

Clave: Proporciones ortoéster/lactona⁴⁴ (a) [6:4]; (b) [7:3]; (c) [3:2]; (d) [3:1].

Tabla II.1. Análogos de TTX cuyo tautómeto tipo ortoéster es la forma predominante a pH fisiológico.

⁴³ Para una revisión bibliográfica sobre los derivados naturales de TTX (**1**), ver: (a) Yotsu-Yamashita, M. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2001**, 20, 51-66. (b) Kobayashi, J.; Ishibashi, M. en *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Mori, K. Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1999; Vol. 8, pp.: 480-485.

⁴⁴ Las proporciones ortoéster/lactona son dependientes del pH. Las proporciones aportadas son en una disolución ácida (4% CD₃CO₂D/D₂O) a 25°C.

Los derivados 6-*epi*-TTX, 11-desoxi-TTX⁴⁵ y los epímeros 11-nor-TTX-6(*R*)-ol⁴⁶ y 11-nor-TTX-6(*S*)-ol,⁴⁷ presentan un equilibrio tautomérico entre sus formas ortoéster (Tabla II.1) y lactona (Tabla II.2) similar al que se observa para la TTX (**1**, Figura II.4).

En el caso de los derivados 4-*epi*-TTX,⁴⁸ 4-*epi*-11-desoxi-TTX, 11-oxo-TTX (aldehído hidratado)⁴⁹ y chiriquitoxina (CTX, que contiene un resto de glicina sobre C-11)⁵⁰ no se observa ningún equilibrio tautomérico (en 4% CD₃CO₂D/D₂O, 25 °C) y únicamente se aíslan sus formas ortoéster (Tabla II.1).

Por otra parte, han sido aislados varios análogos de estructura tipo 5-desoxi-10,7-lactona (Tabla II.2), en los que no se puede formar el hemilacetal, tales como: *N*-hidroxi-5,11-didesoxi-TTX (único derivado *N*-hidroxilado de TTX conocido),⁵¹ 5,6,11-tridesoxi-TTX,⁵² 4-*epi*-5,6,11-tridesoxi-TTX y 5-desoxi-TTX.⁵³

⁴⁵ Los derivados 6-*epi*-TTX y 11-desoxi-TTX fueron aislados de la salamandra *Cynops ensicauda*, ver: (a) Yotsu, M.; Iorizzi, M.; Yasumoto, T. *Toxicon* **1990**, 28, 238-241. (b) Yasumoto, T.; Yotsu, M.; Murata, M.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 2344-2345.

⁴⁶ El análogo 11-nor-TTX-6(*R*)-ol fue aislado del pez globo *Fugu niphobles*, ver: Endo, A.; Khora, S.S.; Murata, M.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4127-4128.

⁴⁷ El análogo 11-nor-TTX-6(*S*)-ol fue aislado por primer vez del pez globo *Arothron nigropunctatus*, ver: Yotsu, M.; Hayashi, Y.; Khora, S.S.; Sato, S.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, 56, 370-371.

⁴⁸ Los derivados 4-*epi*-TTX, 4,9-anhidro-TTX y ácido tetrodónico se aíslan, junto con la TTX (**1**), de los peces globo *Takifugu (Fugu) pardalis* y *Takifugu poecilonotus*, ver: Nakamura, M.; Yasumoto, T. *Toxicon* **1985**, 23, 271-276.

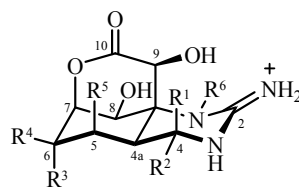
⁴⁹ El análogo 11-oxo-TTX fue aislado del pez globo *Arothron nigropunctatus*, ver: Khora, S.S.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 4393-4394.

⁵⁰ La chiriquitoxina (CTX) es el único derivado de TTX aislado de una rana, la *Atelopus chiriquiensis*, ver: Yotsu, M.; Yasumoto, T.; Kim, Y.H.; Naoki, H.; Kao, C.Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 3187-3190.

⁵¹ El análogo *N*-hidroxi-5,11-didesoxi-TTX fue aislado de la salamandra *Taricha granulosa*, ver: Kotaki, Y.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 827-830.

⁵² El análogo 5,6,11-tridesoxi-TTX fue aislado del pez globo *Fugu poecilonotus*, ver: Yotsu-Yamashita, M.; Yamagishi, Y.; Yasumoto, T. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 9329-9332.

⁵³ Los derivados 4-*epi*-5,6,11-tridesoxi-TTX y 5-desoxi-TTX fueron aislados del pez globo *Fugu poecilonotus*, ver: Yotsu-Yamashita, M.; Schimmele, B.; Yasumoto, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 961-963.

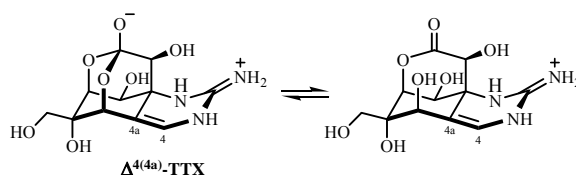


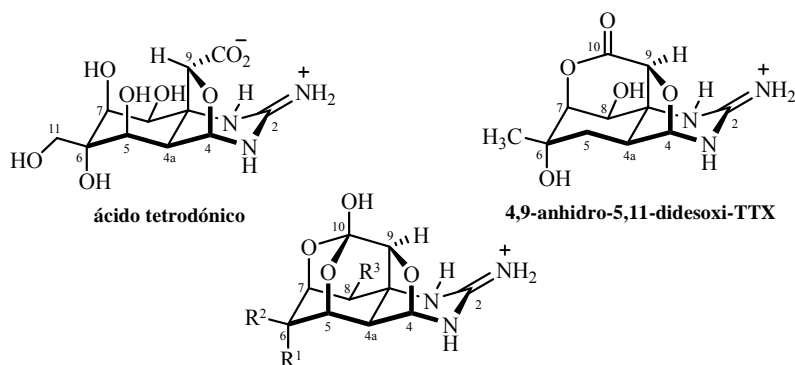
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
TTX (1b) (lactona)	H	OH	OH	CH ₂ OH	OH	H
6-<i>epi</i>-TTX (lactona)	H	OH	CH ₂ OH	OH	OH	H
11-desoxi-TTX (lactona)	H	OH	OH	CH ₃	OH	H
11-nor-TTX-6(<i>S</i>)-ol (lactona)	H	OH	OH	H	OH	H
11-nor-TTX-6(<i>R</i>)-ol (lactona)	H	OH	H	OH	OH	H
11-nor-TTX-6,6-diol (lactona)	H	OH	OH	OH	OH	H
5-desoxi-TTX	H	OH	OH	CH ₂ OH	H	H
5,11-didesoxi-TTX	H	OH	OH	CH ₃	H	H
4-<i>epi</i>-5,11-didesoxi-TTX	OH	H	OH	CH ₃	H	H
1-hidroxi-5,11-didesoxi-TTX	H	OH	OH	CH ₃	H	OH
5,6,11-tridesoxi-TTX	H	OH	H	CH ₃	H	H
4-<i>epi</i>-5,6,11-tridesoxi-TTX	OH	H	H	CH ₃	H	H

Tabla II.2. Análogos de TTX cuyo tautómero tipo lactona es la forma predominante a pH fisiológico.

Los productos de deshidratación 4,9-anhidro-TTX, 4,9-anhidro-6-*epi*-TTX y 4,9-anhidro-11-desoxi-TTX se caracterizan por presentar un único tautómero ortoéster con un puente 4,9-epoxi (Tabla II.3).⁵⁴

⁵⁴ Nuestro grupo de investigación ha propuesto la estructura $\Delta^{4(4a)}$ -TTX (como equilibrio ortoéster/lactona) para uno de los compuestos minoritarios (de masa molecular 301) que se aíslan junto con la TTX (**1**) de algunas especies de pez globo *Takifugu*, ver: Figura II.1 (Unk-1, Mw = 301). Este producto es el precursor de la octaacetato-TTX, uno de los derivados de TTX obtenidos en su reacción de peracetilación.





	R^1	R^2	R^3
4,9-anhidro-TTX	OH	CH ₂ OH	OH
4,9-anhidro-6-<i>epi</i>-TTX	CH ₂ OH	OH	OH
4,9-anhidro-11-desoxi-TTX	OH	CH ₃	OH
4,9-anhidro-TTX-8-<i>O</i>-hemisuccinato	OH	CH ₂ OH	O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂ ⁻
4,9-anhidro-TTX-11-<i>O</i>-hemisuccinato	OH	CH ₂ OCO(CH ₂) ₂ CO ₂ ⁻	OH

Tabla II.3. Análogos de TTX con estructura tipo 4,9-anhidro a pH fisiológico.

El puente 4,9-epoxi estabiliza el tautómero ortoéster de las estructuras 4,9-anhidro (Tabla II.3) que, a diferencia de lo observado para la TTX (**1**), no se encuentra en equilibrio con su tautómero lactona. Del espectro de ¹H-RMN de la 4,9-anhidro-TTX (Figura II.5) se deduce la presencia de un único tautómero ortoéster a diferencia de lo observado en el espectro de ¹H-RMN de la TTX (Figura II.4) que presenta un equilibrio entre los tautómeros ortoéster y lactona, reflejándose una menor complejidad del espectro de ¹H-RMN de la 4,9-anhidro-TTX con respecto al de la TTX.

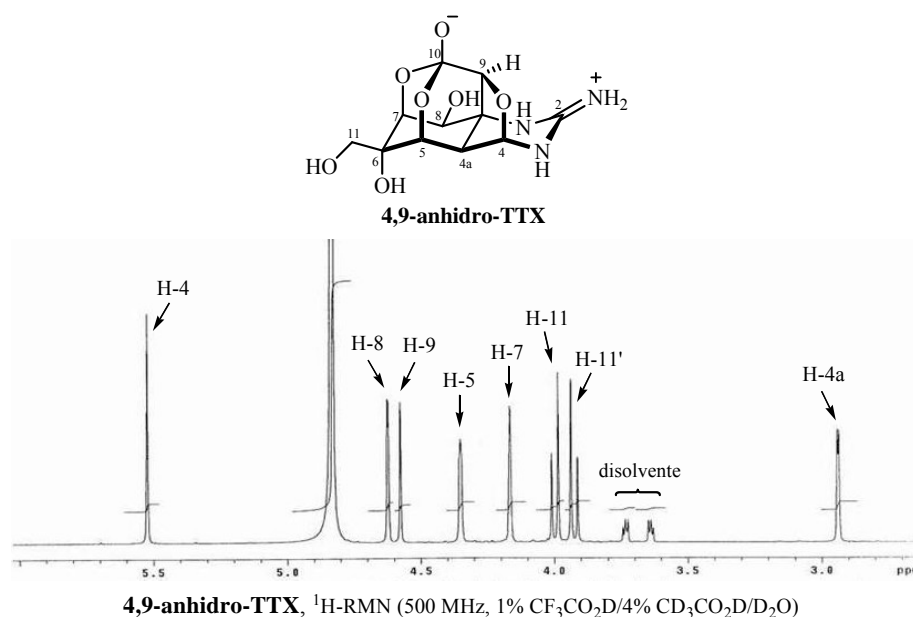


Figura II.5. Espectro de ¹H-RMN de 4,9-anhidro-TTX.

El ácido tetrodónico (o tetrodoico, Tabla I.3)⁵⁵ es la única estructura de tipo 4,9-anhidro que presenta la configuración contraria a la TTX (**1**) en C-9, y como consecuencia de dicha estereoquímica no es posible la formación del ortoéster entre el grupo carboxilo C-10 y los hidroxilos de C-5 y C-7.

Por último, tanto la 4-*epi*-TTX (Tabla II.1) como la 4,9-anhidro-TTX (Tabla II.3) se equilibran con la TTX (**1**) en un medio ácido acuoso (TFA-*d*₄ 4%).⁵⁶

⁵⁵ (a) Ver referencia: 48. (b) Además de obtenerse del pez globo, el ácido tetrodónico se encuentra en los gusanos marinos *Cephalothrix linearis* y *Planocera multitentaculata*, ver: Noguchi, T.; Ali, A.E.; Arakawa, O.; Miyazawa, K.; Kanoh, S.; Shida, Y.; Nishio, S.; Hashimoto, K. *Toxicon* **1991**, 29, 845-855.

⁵⁶ Ver referencia: 48.

D. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE TTX

La tetrodotoxina (TTX, **1**) es una neurotoxina que bloquea selectivamente los canales de sodio dependientes del voltaje, inhibiendo el transporte de los iones Na^+ a través de la membrana excitable de las neuronas. Por otro lado, junto con la saxitoxina (STX), la TTX ha sido empleada como una herramienta indispensable en neurofisiología para identificar y caracterizar estructural y funcionalmente las distintas isoformas de dichos canales iónicos.⁵⁷

D.1. Canales de Sodio Dependientes del Voltaje (Na_v)

Los canales de sodio dependientes del voltaje (Na_v)⁵⁸ son responsables de la generación y propagación del potencial de acción en las neuronas y otras células eléctricamente excitables como los miocitos y las células endocrinas. El transporte selectivo de iones Na^+ a través de la membrana celular cumple un papel

⁵⁷ (a) *Tetrodotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel*; Kao, C.Y.; Levinson, S.R. Eds.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, 479. (b) Anger, T.; Madge, D.J.; Mulla, M.; Riddall, D. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 115-137. (c) Hucho, F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 39-50. (d) Catterall, W.A. *Physiol. Rev.* **1992**, 72, S15-S48. (e) Narahashi, T. *Physiol. Rev.* **1974**, 54, 813-889.

⁵⁸ Sobre la estructura y función de los canales de sodio dependientes del voltaje, ver: (a) Seda, M.; Pinto, F. M.; Wray, S.; Cintado, C. G.; Noheda, P.; Buschmann, H.; Candenas, M. L. *Biol. Reprod.* **2007**, 77, 855-863. (b) Candenas, M. L.; Seda, M.; Noheda, P.; Buschmann, H.; Cintado, C. G.; Martín, J. D.; Pinto, F. M. *Eur. J. Pharm.* **2006**, 541, 9-16. (c) Buschmann, H.; Noheda, P.; Vela, J. M.; Candenas, M. L. Use of Sodium Channel Blockers for the Treatment of Preterm Labor. European Patent Application. EP1844781 A1, 17/10/2007. (d) Hargus, N.J.; Patel, M.K. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, 16, 635-646. (e) Catterall, W.A.; Goldin, A.L.; Waxman, S.G. *Pharmacol. Rev.* **2005**, 57, 397-409. (f) Yu, F.H.; Catterall, W.A. *Genome Biol.* **2003**, 4, 207.1-207.7. (g) Goldin, A.L. *Ann. Rev. Physiol.* **2001**, 63, 871-894. (h) Catterall, W.A. *Neuron* **2000**, 26, 13-25. (i) Marban, E.; Yamagishi, T.; Tomaselli, G.F. *J. Physiol.* **1998**, 508, 647-657. (j) Hanck, D.A.; Fozzard, H.A. en *Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure and Applications*; Chung, S.H.; Andersen, O.S.; Krishnamurthy, V. Eds.; Springer: New York, 2006; p. 219-240. (k) *Ion Channels, Transmitters, Receptors & Disease* [en línea]; Neuromuscular Disease Center, Washington University: St. Louis, 19-6-2007; <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/chan.html>

crucial en la transmisión de los impulsos nerviosos y en el acoplamiento de los procesos de excitación-contracción de los músculos.

D.1.1. Clasificación de Canales Na_v

Los canales de Na^+ dependientes del voltaje son proteínas transmembrana heteroméricas complejas constituidas por una subunidad α asociada a una o varias subunidades β . Hasta la actualidad han sido expresadas diez isoformas α de canal de Na^+ , nueve de ellas ($\text{Na}_v1.1$ - $\text{Na}_v1.9$)⁵⁹ han sido identificadas y expresadas funcionalmente (Tabla II.4) y una de ellas (Na_x) aún no y cuatro subunidades β ($\beta1$ - $\beta4$).⁶⁰

La secuencia de aminoácidos de las nueve isoformas α es idéntica en más de un 50% en los dominios transmembranales y extracelulares. Esto, junto con su relación filogenética y cromosómica,⁶¹ permite considerarlos como miembros de una única familia de proteínas.

⁵⁹ Según la nomenclatura recomendada por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), el nombre de un canal iónico individual está compuesto por el símbolo químico del ion penetrante (Na) y un subíndice que indica el regulador fisiológico principal (voltaje, Na_v). El número siguiente refleja la subfamilia del gen implicado (Na_v1), y separado con un punto, otro número identifica cada isoforma del canal (por ejemplo, $\text{Na}_v1.1$). Ver: (a) Goldin, A.L.; Barchi, R.L.; Caldwell, J.H.; Hofmann, F.; Howe, J.R.; Hunter, J.C. Kallen, R.G.; Mandel, G.; Meisler, M.H.; Netter Y.B.; Noda, M.; Tamkun, M.M.; Waxman, S.G.; Wood, J.N.; Catterall, W.A. *Neuron* **2000**, 28, 365-368. (b) Ref. 58b.

⁶⁰ Cadenas, L.; Seda, M.; Noheda, P.; Buschmann, H.; Cintado, C.G.; Martín, J.D.; Pinto, F.M. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, 541, 9-16; y referencias citadas.

⁶¹ (a) Plummer, N.W.; Meisler, M.H. *Genomics* **1999**, 57, 323-331. (b) Refs. 58b,c.

<i>Canal</i>	<i>Genes Humanos</i>	<i>Velocidad de inactivación</i>	<i>Sensibilidad frente a TTX</i>	<i>Localización Principal</i>
Na _v 1.1	SCN1A	rápido	TTX-S	CNS y DRG
Na _v 1.2	SCN2A	rápido	TTX-S	CNS y DRG
Na _v 1.3	SCN3A	rápido	TTX-S	CNS embrionario
Na _v 1.4	SCN4A	rápido	TTX-S	Músculo esquelético
Na _v 1.5	SCN5A	Lento	TTX-R	Miocitos cardiacos y DRG
Na _v 1.6	SCN8A	rápido	TTX-S	Neuronas motoras PNS y DRG
Na _v 1.7	SCN9A	rápido	TTX-S	DRG y CNS
Na _v 1.8	SCN10A	Lento	TTX-R	PNS y DRG
Na _v 1.9	SCN11A	Lento	TTX-R	PNS y DRG
Na _x	SCN7A	---	---	---

Clave: TTX-S = sensible a TTX; TTX-R = resistente a TTX; CNS = sistema nervioso central; DRG = ganglios de la raíz dorsal; PNS = sistema nervioso periférico.

Tabla II.4. Clasificación, propiedades y distribución de las isoformas α de los canales de Na⁺ dependientes del voltaje.⁶²

Según la sensibilidad frente a tetrodotoxina (TTX, **1**) las diferentes isoformas pueden clasificarse en:

a) Canales sensibles a TTX (TTX-S): Na_v1.1-Na_v1.4, Na_v1.6 y Na_v1.7, con un valor de IC₅₀ de rango nanomolar.⁶³

b) Canales resistentes a TTX (TTX-R): Na_v1.5, Na_v1.8 y Na_v1.9, con un valor de IC₅₀ de orden micromolar.

Cada una de estas isoformas se expresa mayoritariamente en tipo de tejido determinado (Tabla II.4). Se establece que los canales Na_v1.1-Na_v1.3 y Na_v1.7 se

⁶² Tabla elaborada a partir de los datos recogidos en Refs. 57b y 58a,b.

⁶³ (a) En este caso, el término IC₅₀ es utilizado para indicar la concentración molar de TTX que inhibe al 50% el transporte de iones a través del canal Na_v. (b) Para una revisión general de los parámetros usados para cuantificar las interacciones ligando-receptor recomendados por la Unión Internacional de Farmacología (IUPHAR), ver: Neubig, R.R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. *Pharmacol. Rev.* **2003**, *55*, 597-606.

encuentran principalmente en el sistema nervioso central (CNS), los Na_v1.4 en el músculo esquelético, los Na_v1.5 en el corazón y las isoformas Na_v1.8 y Na_v1.9 en el sistema nervioso periférico (PNS).⁶⁴

D.1.2. Estructura de los Canales Na_v⁶⁵

Los canales de Na⁺ dependientes del voltaje están constituidas por una subunidad α de ~260 kDa, formadora del poro, asociada a una o más subunidades β auxiliares de 33-45 kDa (Figura II.6).

La subunidad α se compone de cuatro dominios homólogos (DI-DIV), cada uno contiene seis segmentos helicoidales (S1-S6) que atraviesan la membrana plasmática, y presenta los grupos amino y carboxilo terminal situados intracelularmente.

Los segmentos transmembrana están conectados mediante pequeños bucles, siendo el mayor de ellos el que enlaza S5 y S6 de forma extracelular reentrando en la membrana. Por otra parte, los cuatro dominios se unen a través de lazos citoplasmáticos grandes.

El segmento S4 de cada dominio es anfipático y contiene numerosos residuos cargados positivamente de arginina y/o lisina, junto a otros residuos hidrofóbicos, lo que le permite actuar como sensor de voltaje del canal.⁶⁶ Dichos residuos responden a la despolarización (decrecimiento del potencial) de la membrana orientando sus cargas positivas hacia el exterior del poro, lo que inicia la activación (apertura) del canal y permite que los iones Na⁺ lo atraviesen.

⁶⁴ (a) Mechaly, I.; Scamps, F.; Chabbert, C.; Sans, A.; Valmier, J. *Neuroscience* **2005**, *130*, 389-396. (b) Refs. 58c y 60.

⁶⁵ Ver: Referencia 58.

⁶⁶ (a) Yang, N.; George, A.L.Jr.; Horn, R. *Neuron* **1996**, *16*, 113-122. (b) Stühmer, W.; Conti, F.; Suzuki, H.; Wang, X.; Noda, M.; Yahagi, N.; Kubo, H.; Numa, S. *Nature* **1989**, *339*, 597-603.

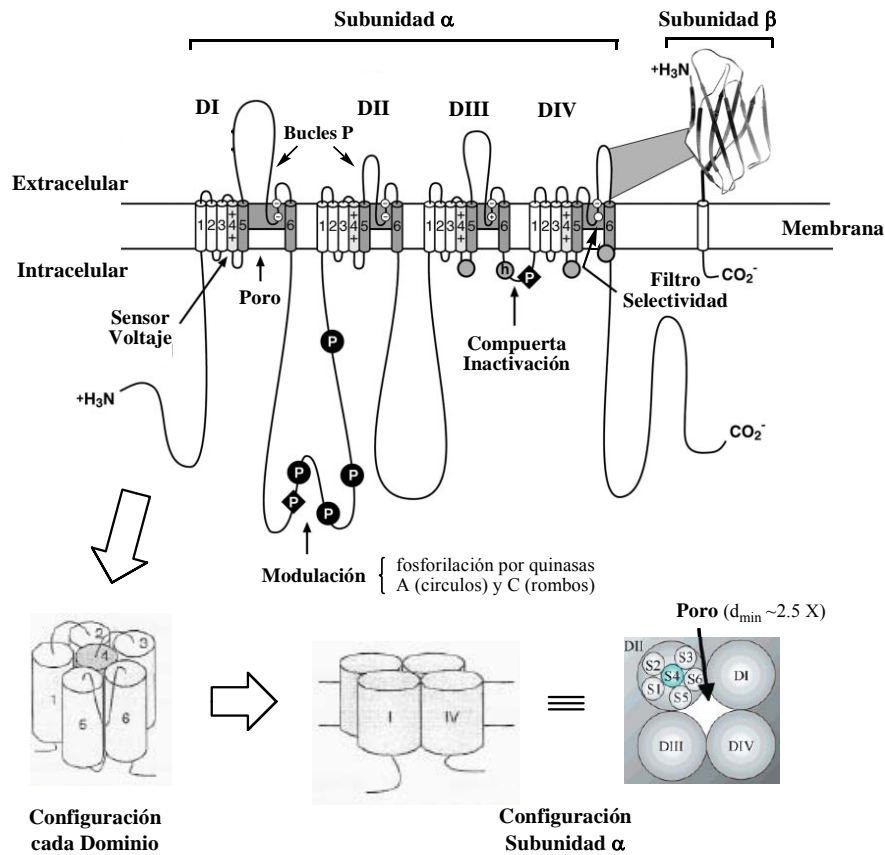


Figura II.6. Representación esquemática de la estructura de los canales de Na^+ dependientes del voltaje (se muestra la organización transmembrana de su subunidad α).⁶⁷

Los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios, así como el lazo intramembrana P (re-entrante) que los unen, conforman el poro conductor de iones (Figura II.7).^{68,69} El vestíbulo exterior del poro está constituido por los

⁶⁷ Figura modificada de Ref. 58a.

⁶⁸ Sobre la modelización molecular de la estructura del poro de los canales de sodio dependientes del voltaje, ver: (a) Scheib, H.; McLay, I.; Guex, N.; Clare, J.J.; Blaney, F.E.; Dale, T.J.; Tate, S.N.; Robertson, G.M. *J. Mol. Model* **2006**, *12*, 813-822. (b) Lipkind, G.M.; Fozzard, H.A. *Biochemistry* **2000**, *39*, 8161-8170. (c) Bénitah, J-P.; Ranjan, R.; Yamagishi, T.; Janecki, M.; Tomaselli, G.F.; Marban, E. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 603-613. (d) Lipkind, G.M.; Fozzard, H.A. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1-13.

son críticos tres residuos aminoácidos hidrofóbicos (isoleucina, fenilalanina y metionina, conocida como secuencia IFM), que actúan como una compuerta de inactivación que bloquea la boca interior del poro durante la despolarización de la membrana.⁷²

Por otra parte, han sido identificados algunos sitios de fosforilación por las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC) en los lazos interiores que conectan los dominios I-II, por un lado, y III-IV, por otro.⁷³ Ambas quinasas A y C han sido implicadas en procesos de dolor inflamatorio y neuropático, respectivamente.⁷⁴

Aunque la expresión de la subunidad α por si sola es suficiente para formar el canal iónico, las subunidades β adicionales modulan su funcionamiento, siendo especialmente importantes durante la expresión, localización y plegamiento del canal.⁷⁵ Estas proteínas β contienen un único dominio transmembranal con el extremo amino extracelular y el carboxilo final intramolecular.

D.1.3. Funcionamiento de los Canales Na_v ⁵⁸

Los canales de Na^+ dependientes del voltaje presentan al menos tres estados conformacionalmente funcionales (Figura II.8): *de reposo* (cerrado pero activable), *activo* (abierto) e *inactivo* (cerrado).

⁷² (a) Rohl, C.A.; Boeckman, F.A.; Baker, C.; Scheuer, T.; Catterall, W.A.; Klevit, R.E. *Biochemistry* **1999**, 38, 855-861. (b) West, J.W. Patton, D.E.; Scheuer, T.; Wang, Y.; Goldin, A.L.; Catterall, W.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 10910-10914.

⁷³ (a) Murphy, B.J.; Rossie, S.; De Jongh, K.S.; Catterall, W.A. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 27355-27362. (b) West, J.W.; Numann, R.; Murphy, B.J.; Scheuer, T.; Catterall, W.A. *Science* **1991**, 254, 866-868.

⁷⁴ Yajima, Y.; Narita, M.; Shimamura, M.; Narita, M.; Kubota, C.; Suzuki, T. *Brain Res.* **2003**, 992, 288-293.

⁷⁵ (a) Hanlon, M.R.; Wallace, B.A. *Biochemistry* **2002**, 41, 2886-2894. (b) Isom, L.L. *Am. J. Physiol.* **2000**, 278, G349-G353.

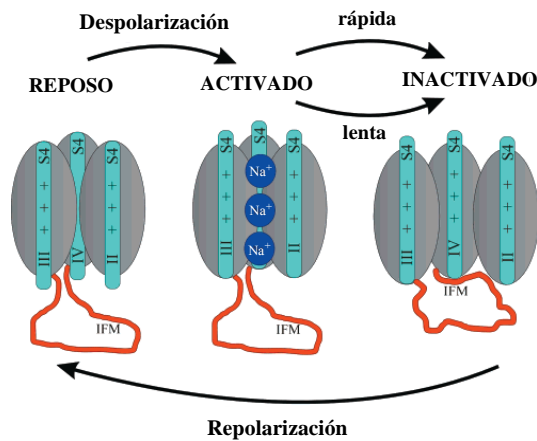


Figura II.8. Relación entre los estados *de reposo*, *activo* e *inactivo* de los canales Na_v .⁷⁶

Bajo el potencial residual de membrana (menores a -60 mV), los canales Na_v suelen encontrarse cerrados y no son conductores (en un estado *de reposo*). La despolarización de la membrana (disminución del potencial que se hace menos negativo), aumenta la probabilidad de activación del canal, el cual se abre bruscamente permitiendo que los iones Na^+ fluyan hacia el interior celular (estado *activo*). Esta afluencia de iones cargados positivamente genera una inversión momentánea de la polaridad que constituye el potencial de acción. Cuando se produce la despolarización, los segmentos cargados S4 de cada dominio homólogo, sensores de voltaje, se desplazan hacia el exterior de la membrana iniciando un cambio conformacional que implica a los bucles intramembrana P y abre el poro del canal (Figura II.8).

La inactivación (cierre) del canal Na_v se produce de forma rápida (en milisegundos) e inmediatamente después de su apertura. El lazo intracelular que conecta los dominios III y IV contiene la secuencia hidrofóbica IFM que se comporta como una tapadera que cierra el poro del canal por su extremo citoplasmático, permaneciendo así durante toda la despolarización y abriéndose

⁷⁶ Figura modificada de Ref. 57b.

únicamente cuando se vuelve a repolarizar la membrana (Figura II.8). Esta inactivación rápida de los canales de sodio debe contribuir a la terminación del potencial de acción y a la regulación del periodo refractario posterior.

Cuando las despolarizaciones son prolongadas, los canales Na_v sufren un proceso conocido como inactivación lenta (de segundos a minutos). En este caso, el mecanismo de inactivación es más complejo e involucra el alineamiento adicional de una serie de aminoácidos de los segmentos S6. Esta inactivación lenta debe contribuir sobre todo a la excitabilidad de la membrana al incrementar el umbral del potencial de acción, de tal modo que limitan su duración y propagación a través del axón neuronal.

Una vez el canal Na_v ha alcanzado el estado *inactivo*, éste debe recuperar de nuevo el estado activable *de reposo* para poder abrirse en la despolarización siguiente. Esta recuperación ocurre durante la repolarización de la membrana e involucra el movimiento de los segmentos S4 hacia el interior de la membrana y de la puerta de inactivación IFM lejos de la boca intracelular del poro (Figura II.8).

D.2. Interacción entre TTX y los Canales Na_v ⁷⁷

La tetrodotoxina (TTX, **1**) y la saxitoxina (STX) se unen de forma competitiva a un sitio específico (*sitio 1*) de la subunidad α de los canales Na_v , bloqueando el extremo extracelular del poro e inhibiendo el transporte de iones Na^+ a través de la membrana plasmática (Tabla I.5). La unión de la TTX al canal

⁷⁷ Sobre la interacción entre TTX y los canales Na_v , ver: (a) Kobayashi, J.; Ishibashi, M. en *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Mori, K. Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1999; Vol. 8, p. 485-489. (b) Soong, T.W.; Venkatesh, B. *Trends Gen.* **2006**, 22, 621-626. (c) Choudhary, G.; Yotsu-Yamashita, M.; Shang, L.; Yasumoto, T.; Dudley, S.C. Jr. *Biophys. J.* **2003**, 84, 287-294. (d) Narahashi, T. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **2001**, 20, 67-84. (e) Penzotti, J.L.; Fozzard, H.A.; Lipkind, G.M.; Dudley, S.C. Jr. *Biophys. J.* **1998**, 75, 2647-2657. (f) Yang, L.; Kao, C.Y. *J. Gen. Physiol.* **1992**, 100, 609-622. (g) Refs. 57a y 68a.

Na_v es reversible (permanecen enlazadas unas decenas segundos), extremadamente fuerte ($K_d = 1\text{-}10\text{ nM}$)⁷⁸ e independiente de la conformación del canal.

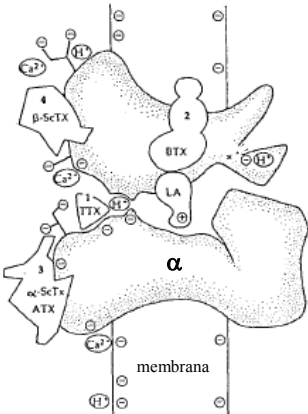
Sitio de unión (receptor)	Ligandos	Dominios	Efecto fisiológico	
	1	tetrodotoxina saxitoxina μ -conotoxina	IS2-S6, IIS2-S6 IIIS2-S6, IVS2-S6	inhiben el transporte de iones
	2	veratridina batrachotoxina aconitina grayanotoxina	IS6, IVS6	abren el canal, activación persistente
	3	toxinas escorpión α toxinas anémoma II δ -atracotoxinas	IS5-IS6, IVS3-S4 IVS5-S6	ralentizan la inactivación, activación persistente
	4	toxinas escorpión β	IS1-S2, IIS3-S4	realzan la activación
	5	brevetoxinas ciguatoxinas	IS6, IVS5	abren el canal e inhiben su inactivación
	6	δ -conotoxinas	IVS3-S4	inhiben la activación
	7	anestésicos locales anticonvulsivos	IS6, IIIS6, IVS6	inhiben el transporte de iones

Tabla II.5. Sitios de unión de diferentes neurotoxinas en los canales Na_v (se incluye una representación de su localización dentro del canal).⁷⁹

El sitio de enlace de TTX (*sitio* 1, Tabla II.5) está constituido por dos conjuntos de aminoácidos alineados, cargados negativamente, que ocupan posiciones análogas en el bucle P que conecta los segmentos S5 y S6 de cada uno de los cuatro dominios. Estos residuos intramembrana forman dos anillos (Figura II.9): uno externo, con los aminoácidos E403 en DI, E758 en DII, M1240 en DIII y D1532 en DIV (secuencia EEMD); y otro interno, con los aminoácidos D400 en

⁷⁸ La constante de disociación (K_d) es un parámetro utilizado para describir, de manera inversa, la afinidad de un receptor por su ligando. Es decir, cuanto menor sea K_d , mayor será dicha afinidad y más fuerte será la unión ligando-receptor. Ver Ref. 63b.

⁷⁹ Tabla elaborada a partir de los datos recogidos en Refs. 57b, c y 58b.

DI, E755 en DII, K1237 en DIII y A1529 en DIV (secuencia DEKA), zona más estrecha del poro que funciona como filtro de la selectividad del canal.⁸⁰

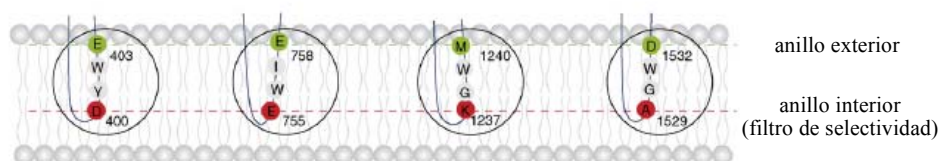


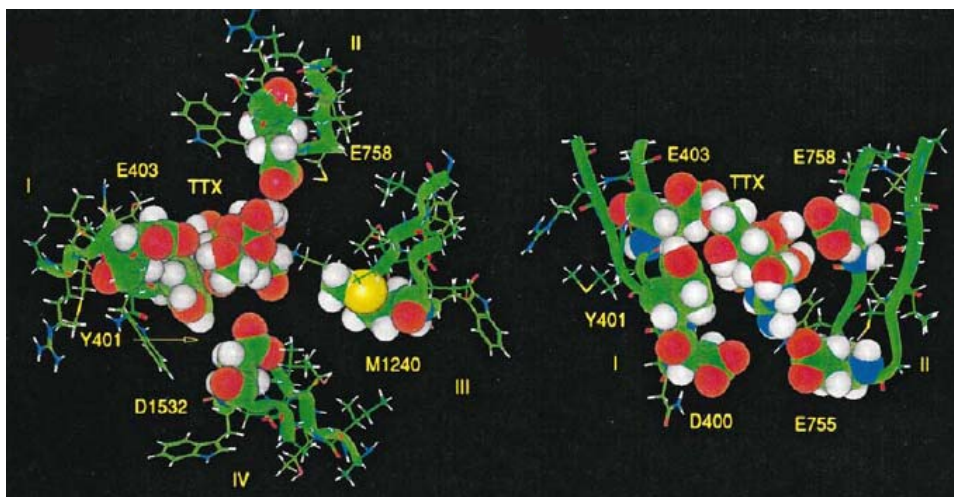
Figura II.9. Secuencias de aminoácidos DEKA (interior) y EEMD (exterior) del poro del canal Na_v con las que interacciona la molécula de TTX.⁸¹

A pesar de que todas las isoformas de la subunidad α presentan estos dos anillos, la diferencia en un aminoácido del bucle P del dominio I (el residuo 401) es crucial para discriminar la sensibilidad a la TTX de los distintos canales Na_v.^{77d} Así, los canales Na_v del sistema nervioso central y el músculo esquelético (*TTX-S*) contienen un aminoácido aromático en la posición 401, una fenilalanina o una tirosina, respectivamente. Sin embargo, los canales Na_v1.5 del músculo cardíaco que contienen una cisteína-401 son 200-1000 veces menos sensibles a la TTX (*TTX-R*). Los canales Na_v1.8 y Na_v1.9 de los ganglios de la raíz dorsal, con un resto de serina en el dominio I, son aún más resistentes a dicha toxina.

En resumen, la identidad de un residuo particular en la región de P del dominio I explica la sensibilidad frente a TTX observada para cada isoforma de Na_v: un aminoácido aromático en esta posición (401) confiere alta afinidad, mientras que su ausencia hace al canal *TTX-R*.

⁸⁰ La numeración indicada para estos aminoácidos corresponde a la secuencia primaria de los canales Na_v1.4 del músculo esquelético de rata. Ver Ref. 77c.

⁸¹ Figura tomada de Ref. 77b.



Clave de colores: carbonos en verde; nitrógenos en azul;
oxígenos en rojo; azufres en amarillo; hidrógenos en blanco.

Figura II.9. Modelo que muestra la orientación propuesta para la TTX dentro del vestíbulo exterior de los canales Na_v .⁸²

La orientación propuesta para la TTX dentro del vestíbulo exterior del poro del correspondiente canal Na_v (Figura II.9) se caracteriza por presentar: a) una interacción electrostática del grupo guanidinio (cargado positivamente) con el filtro de selectividad DEKA; b) un apilamiento de la superficie apolar C4-C5-C7-C8 de la toxina con el residuo aromático Tyr401 (DI) y, probablemente, una interacción O-H... π entre C-8 y el anillo aromático; c) los grupos hidroxilo de C-4 y C-9 situados cerca del residuo Glu758 (DII) y el oxígeno del ortoéster C-10 próximo al Glu403 (DI); y d) el grupo hidroxilo de C-11 se dispone en las proximidades del Asp1532 (DIV),^{77c} lo que permite proponer la formación de un enlace de hidrógeno con el grupo carboxilo de dicho aminoácido (Figura II.11).⁸³

⁸² Figura tomada de Ref. 77e.

⁸³ Alternativamente, Penzotti y col. han propuesto las siguientes interacciones: a) E755 (DII) con N-1, N-2 y N-3; b) Y401 (DI) con superficie apolar de C-4, C-5, C-7 y C-8 (posible interacción C-H... π); c) E758 (DII) con C-9 y C-10; y d) E403 (DI) con C-11. Ver Ref. 77e.

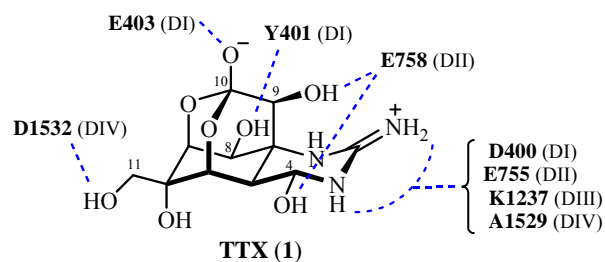


Figura II.11. Interacciones entre TTX (**1**) y el canal de Na_v propuestas por Choudhary y col.

Las toxinas TTX y STX, de tamaño y funcionalidad similar, bloquean el canal Na_v empleando el mismo mecanismo (*sitio* 1, Tabla II.5). Aunque la unión de la guanidina con el filtro de selectividad DEKA es semejante, la presencia de un segundo grupo guanidinio en la STX implica importantes diferencias en su interacción con los residuos Tyr401, Glu758 y Asp1532.⁸⁴

D.3. Relación Estructura-Actividad de TTX

La modificación química de TTX (**1**) está extremadamente limitada debido a su compleja estructura y a sus inusuales propiedades químicas. Por ello, la relación estructura-actividad de TTX ha sido estudiada a través de sus análogos naturales y de algunos derivados semisintéticos del producto natural (Tabla II.6).⁸⁵

⁸⁴ Para una discusión sobre las diferencias en la interacción de las toxinas TTX y STX con el vestibulo exterior de los canales Na_v, ver Ref. 77e.

⁸⁵ Para unas discusiones generales sobre la relación estructura-actividad de TTX (**1**), ver: (a) Kobayashi, J.; Ishibashi, M. en *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Mori, K. Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1999; Vol. 8, pp. 480-485. (b) Yotsu-Yamashita, M.; Sugimoto, A.; Takai, A.; Yasumoto, T. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 289, 1688-1696. (c) Kao, C.Y. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1986**, 479, 52-67.

COMPUESTOS	IC ₅₀ (nM) ^a	K _d (nM) ^b	ED ₅₀ (nM) ^c
TTX (1)	13.7 ± 1.5	1.8 ± 0.1	4.6 ± 0.7
Chiriquitoxina	6.9 ± 1.9	1.0 ± 0.1	---
11-oxo-TTX	11.6 ± 1.8	1.5 ± 0.2	---
11-nor-TTX-6,6-diol	13.7 ± 1.1	1.6 ± 0.1	---
11-nor-TTX-6(<i>S</i>)-ol	161 ± 25	23 ± 1	---
11-nor-TTX-6(<i>R</i>)-ol	186 ± 25	31 ± 3	---
11-desoxi-TTX	279 ± 38	37 ± 2	270 ± 74
6- <i>epi</i> -TTX	295 ± 35	39 ± 3	---
4- <i>epi</i> -TTX	384 ± 45	68 ± 10	---
4,9-anhidro-TTX	1142 ± 256	180 ± 11	---
TTX-8- <i>O</i> -hemisuccinato	2553	> 380	---
ác. TTX-11-carboxílico	> 3000	> 2300	---
ác. Tetrodónico	> 3000	> 3600	---
5,6,11-tridesoxi-TTX	---	> 5000	---
8,11-didesoxi-TTX	---	---	9300 ± 3300

^a Los valores IC₅₀ (concentración requerida para inhibir al 50% la actividad) se obtuvieron mediante experimentos electrofisiológicos [Ref. 85a,c]. ^b Las constantes de disociación (K_d) fueron estimadas a partir de los datos recogidos en los ensayos de unión competitiva de los análogos de TTX y [³H]-STX con los canales Na_v1.4 de la membrana sináptica de cerebro de rata [Ref. 85b]. ^c Con ED₅₀ (dosis de ligando que produce el 50% de la respuesta efectiva máxima) se midió la actividad inhibitoria de la citotoxicidad de veratridina y ouabaina en neuroblastomas de ratón [Ref. 87].

Tabla II.6. Actividad biológica de los análogos de TTX.

Estos estudios han revelado que el grupo guanidinio (pK_a = 11.6), junto con el hemiaminal de C-4 (OH), el ortoéster C-10 (pK_a = 8.7) y el grupo hidroxilo en C-9 son esenciales, mientras que los grupos hidroxilos de C-6 y C-11 puede ser modificados sin una pérdida significativa de actividad biológica (Figura I.14). Recientemente, la síntesis total de 8,11-didesoxi-TTX,⁸⁶ primer 8-desoxi análogo de TTX (no natural), ha permitido evidenciar la importante contribución del grupo

⁸⁶ Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, 251-257.

hidroxilo de C-8 en el mantenimiento de la actividad (Tabla II.6).⁸⁷

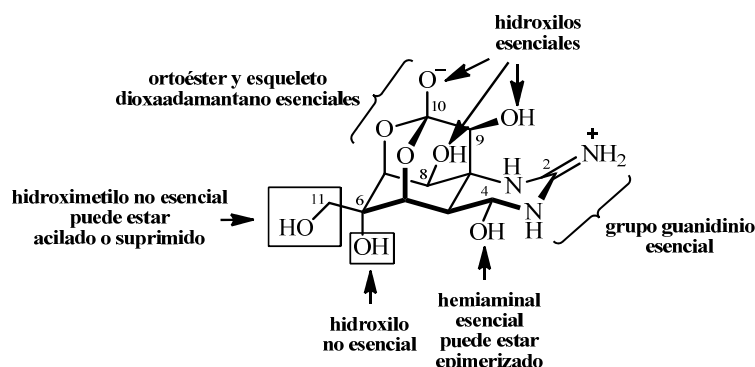


Figura II.12. Relación estructura-actividad de TTX (1).

D.4. Propiedades Farmacológicas de TTX

D.4.1. Toxicidad de TTX

La toxicidad de la TTX (1) se debe a que bloquea los canales Na_v de las membranas de las neuronas y otras células excitables, lo que conlleva la parálisis del sistema neuromuscular y, en consecuencia, la muerte por fallo respiratorio.

La TTX es una de las toxinas no peptídicas más potentes que se conocen, 10.000 veces más mortal que el cianuro.⁸⁸ La intoxicación se puede producir por ingestión,⁸⁹ inhalación o inoculación de la toxina, siendo la dosis letal (LD_{50})⁹⁰ en

⁸⁷ Yotsu-Yamashita, M.; Urabe, D.; Asai, M.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Toxicon* **2003**, 42, 557-560.

⁸⁸ Sobre la toxicidad de la TTX (1), ver: (a) Patockaa, J.; Stredab, L. "Brief Review of Natural Nonprotein Neurotoxins", *ASA Newsletter* **2002**, 2(89) [en línea]; Applied Science and Analysis, Inc.; <http://www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/Neurotoxins.htm> (b) Benzer, T.I. *Toxicity, Tetrodotoxin* [en línea]; eMedicine.com, 16-1-2007; <http://www.emedicine.com/emerg/topic576.htm>

⁸⁹ De hecho, la intoxicación alimentaria por el consumo de algunas especies de pez globo de la familia *Tetraodontidae* es frecuente en Japón, donde el *fugu* es un plato tradicional muy apreciado. La TTX se concentra mayoritariamente (a niveles letales) en las gónadas e hígado de

ratas de 8 $\mu\text{g/Kg}$, si es inyectada, o 30 $\mu\text{g/Kg}$, cuando es ingerida. La TTX inhalada también resulta ser extremadamente tóxica, observándose un valor LD_{50} en humanos de cerca de 2 $\mu\text{g/Kg}$.

El primer síntoma de intoxicación con TTX aparece entre 20 minutos y tres horas después de su ingestión, y consiste en un entumecimiento leve de labios y lengua. En una segunda fase, la insensibilidad se generaliza e intensifica, produciéndose parálisis y descoordinación muscular, hipotensión, debilitamiento mental, arritmia cardíaca y, finalmente, un fallo respiratorio que conduce a la muerte en un plazo de 4-6 horas. Debido a que la toxina actúa sobre todo en los nervios periféricos y no parece atravesar la barrera hematoencefálica, la víctima, aun estando totalmente paralizada, puede permanecer consciente hasta poco antes de morir.

D.4.2. Posible Uso Terapéutico de TTX⁹¹

El interés por descubrir nuevas drogas que actúen sobre los canales Na_v para tratar desordenes neurológicos, incluido el dolor neuropático, se basa en el hecho de que los canales Na_v juegan un papel clave en el control de la excitabilidad de las neuronas.

La característica actividad biológica de la TTX, que actúa específicamente sobre los canales Na_v del nervio y músculo esquelético pero no

dichos peces, los cuales son inmunes al efecto de la toxina debido a una mutación de sus canales Na_v [Soong, T.W.; Venkatesh, B. *Trends Gen.* **2006**, 22, 621-626].

⁹⁰ En toxicología se denomina LD_{50} (dosis semiletal) a aquella dosis de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba, es decir, aquella dosis que tiene una probabilidad de 50% de ser letal.

⁹¹ Sobre la implicación de los canales de Na^+ dependientes del voltaje en el dolor de origen neuropático, ver: (a) Hargus, N.J.; Patel, M.K. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2007**, 16, 635-646. (b) Priestley, T.; Hunter, J.C. *Drug Dev. Res.* **2006**, 67, 360-375. (c) Amir, R.; Argoff, C.E.; Bennett, G.J.; Cummins, T.R.; Durieux, M.E.; Gerner, P.; Gold, M.S.; Porreca, F.; Strichartz, G.R. *J. Pain* **2006**, 7, S1-S29. (d) *Sodium Channels, Pain, and Analgesia*; Coward, K.; Baker, M.D. Eds.; Birkhäuser Verlag: Berlin, 2005.

*del músculo cardiaco, junto con su eficacia analgésica (3000 veces mayor que la de la morfina pero sin ninguno de los efectos secundarios nocivos de los opioides, es decir, no es narcótica ni produce adicción), ha convertido a dicha toxina en un prometedor candidato a fármaco para el tratamiento de cierto tipo de dolor.*⁹²

E. BIOSÍNTESIS DE TETRODOTOXINA

Hasta la fecha, poco se sabe de la biosíntesis de TTX (**1**). Todavía no se ha conseguido identificar ninguna de las posibles enzimas implicadas en su preparación, por lo que las especulaciones realizadas sobre su origen biogenético están apoyadas en las particularidades estructurales de los distintos derivados naturales de TTX que se han ido aislando.⁹³

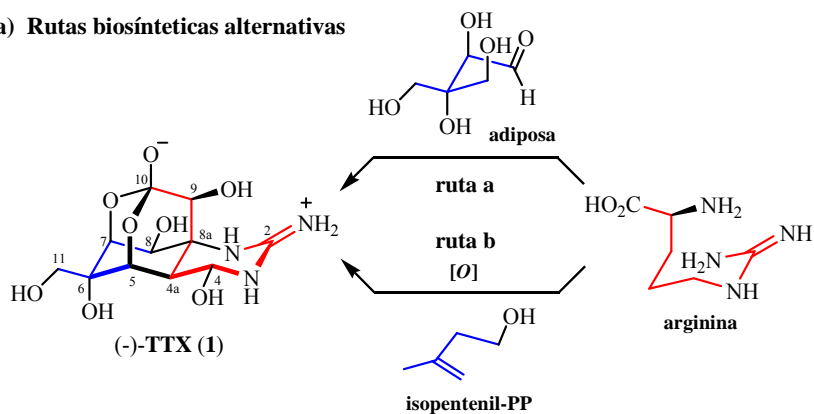
De forma análoga a lo propuesto para otros alcaloides guanidínicos, como saxitoxina (STX),⁹⁴ la biosíntesis de TTX implicaría la participación de una arginina, precursora del grupo guanidinio, y una unidad carbonada de cinco miembros derivada de algún aminoácido, isoprenoide, shikimato o carbohidrato ramificado (Esquema II.2). Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se ha propuesto una ruta biosintética alternativa para la TTX a través de la ruta del shikimato, siendo el ácido shikímico el precursor del anillo carbonado ciclohexánico de la tetrodotoxina.

⁹² Actualmente, algunas empresas farmacéuticas están desarrollando la posible aplicación de TTX en el tratamiento de dolores oncológicos resistentes a los opioides, frente a la deshabituación de drogas y como anestésico local, ver: (a) Laboratorios del Dr. Esteve, S.A. [en línea]; <http://www.esteve.es/EsteveFront/Proyectos.do?op=DP&div=id&con=14&cm=132> (b) WEX Pharmaceuticals Inc. [en línea]; <http://www.wexpharma.com/products/index.htm>

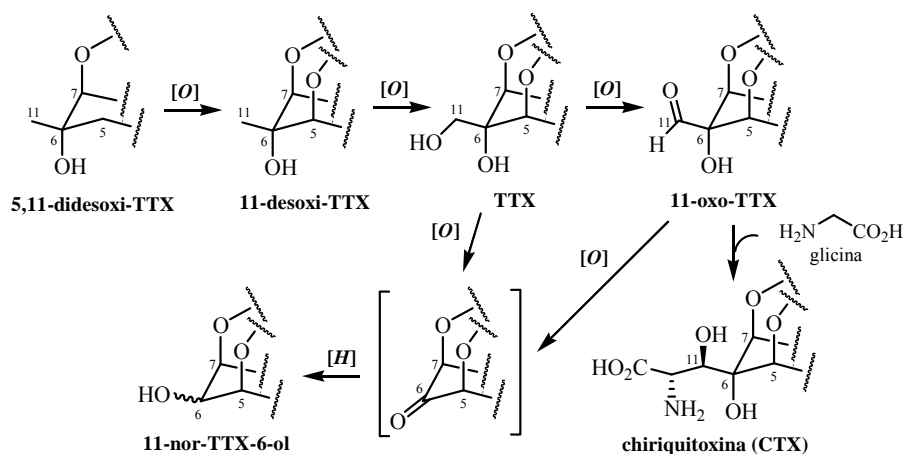
⁹³ Para una breve revisión sobre la biosíntesis de TTX (**1**), ver: Kobayashi, J.; Ishibashi, M. en *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Mori, K. Ed.; Elsevier: Oxford, 1999; vol. 8, p. 480-485.

⁹⁴ Sobre la biosíntesis de alcaloides guanidínicos derivados de arginina, ver el apartado I de esta *Introducción*.

a) Rutas biosintéticas alternativas



b) Oxidación progresiva en la ruta b



Esquema II.2. Rutas biosintéticas de TTX (**1**) y análogos propuestas por los grupos de Shimizu y Yasumoto.

Las variaciones estructurales observadas entre los derivados 11-desoxi-TTX, 11-nor-TTX-6-ol (ambos epímeros), 11-oxo-TTX y chiriQuitoxina (CTX), que se limitan a distintos grados de oxidación o sustitución de las posiciones C-6 y C-11, son compatibles con las dos rutas biosintéticas alternativas que parten de arginina, planteadas por Shimizu y col.,⁹⁵ que se muestran en el Esquema II.2a.

⁹⁵ Shimizu, Y.; Kobayashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 3625-3631.

Sin embargo, el aislamiento de análogos de TTX que carecen de algún grupo oxigenado sobre su esqueleto ciclohexánico como la 1-hidroxi-5,11-didesoxi-TTX,⁹⁶ parece indicar que la TTX procede, efectivamente, de una oxidación progresiva de un sistema alicíclico accesible por condensación de una arginina con un isoprenoide tipo isopentenil-pirofosfato, tal como sugirió Yasumoto y col.⁹⁷ (ruta b, Esquema II.2), y excluye la posibilidad de que el origen del fragmento de cinco carbonos sea un carbohidrato ramificado (ruta a, Esquema II.2).

F. SÍNTESIS DE TETRODOTOXINA^{98,99}

Tanto por su singular estructura química, como por su interesante actividad biológica, son muchos los grupos de investigación que han abordado la síntesis de la tetrodotoxina (TTX, **1**). Sin embargo, debido a su elevada complejidad estructural, hasta la fecha, sólo el grupo de Kishi en 1972 y más recientemente los laboratorios de Isobe (2003 y 2004), Du Bois (2003) y Sato

⁹⁶ Kotaki, Y.; Shimizu, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 827-830.

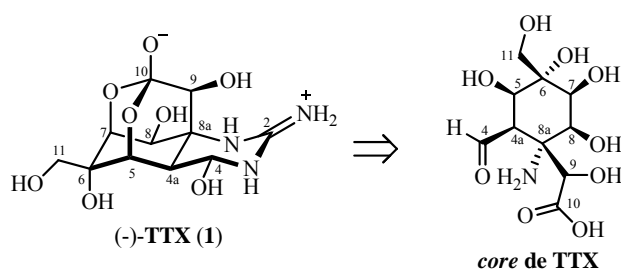
⁹⁷ (a) Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1897-1909. (b) Yasumoto, T.; Yotsu, M.; Endo, A.; Murata, M.; Naoki, H. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 505-508. (c) Yasumoto, T.; Yotsu, M.; Murata, M.; Naoki, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 2344-2345.

⁹⁸ Todas las estructuras e intermedios que aparecen en esta sección se numerarán de acuerdo con la numeración establecida para (-)-TTX (**1**) en el apartado de *Nomenclatura*.

⁹⁹ (a) **Sobre aproximaciones hacia la TTX**, ver: Keana, J. F. W.; Boyle, P. J.; Erion, M.; Hartling, R.; Husman, J. R.; Richman, J. E.; Roman, R. B.; Wah, R. M. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3621-3626; Burgey, C. S.; Vollerthun, R.; Fraser-Reid, B. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1609-1618; Itoh, T.; Watanabe, M.; Fukuyama, T. *Synlett* **2002**, 1323-1325; Noya, B.; Paredes, M. D.; Ozores, L.; Alonso, R. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5960-5968; Taber, D. F.; Storck, P. H. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7768-7771; Ohtani, Y.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Synlett* **2003**, 619-622; Mendelsohn, B. A.; Ciufolini, M. A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4736-4739; Nishikawa, T.; Urabe, D.; Isobe, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4782-4785. (b) **Para síntesis formales de TTX**, ver: Sato, K.; Akai, S.; Shoji, H.; Sugita, N.; Yoshida, S.; Nagai, Y.; Suzuki, K.; Nakamura, Y.; Kajihara, Y.; Funabashi, M.; Yoshimura, J. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1234-1242; Akai, S.; Seki, H.; Sugita, N.; Kogure, T.; Nishizawa, N.; Suzuki, K.; Nakamura, Y.; Kajihara, Y.; Yoshimura, J.; Sato, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2010**, *83*, 279-289; Cagide-Fajín, F.; Alonso, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6741-6747.

(2005), han completado con éxito la síntesis total del producto natural (el primero y el último, en su forma racémica).

La mayoría de las aproximaciones sintéticas a la TTX (**1**) descritas en la literatura se basan en una estrategia inicial común que consiste en preparar el anillo de ciclohexano completamente sustituido (*core* de TTX), esqueleto carbonado que contiene siete centros estereogénicos contiguos (dos de ellos cuaternarios, C-6 y C-8a), antes de instalar los grupos polares guanidina y ortoéster ácido (Esquema II.3).



Esquema II.3. Análisis retrosintético inicial propuesto para la (-)-TTX (**1**).

F.1. Síntesis Totales de TTX

Como ya se ha indicado, hasta la fecha, sólo existen cinco síntesis totales de tetrodotoxina (TTX, **1**), tres de ellas asimétricas,¹⁰⁰ que han sido desarrolladas por los grupos de investigación de:

- **Y. Kishi**: primera síntesis total de *rac*-TTX (1972).
- **M. Isobe**: primera síntesis de (-)-TTX enantioméricamente pura (2003).
Posteriormente (en 2004), completan otra síntesis total más versátil y eficiente, siguiendo la misma estrategia que emplearon a la hora de

¹⁰⁰ Para una revisión bibliográfica sobre las síntesis totales de TTX (**1**), ver: (a) Chau, J.; Ciufolini, M. A. *Mar. Drugs* **2011**, 9, 2046- 2074. (b) Koert, U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5572-5576.

synetizar los análogos: 5,11-didesoxi-TTX (1999), 8,11-didesoxi-TTX (2002) y 11-desoxi-TTX (2002).

- **J. Du Bois**: síntesis asimétrica de (-)-TTX (2003), la más eficiente de las publicadas.
- **K. Sato**: síntesis total del racémico de TTX (2005), 33 años después de la de Kishi.

F.1.1. Síntesis de *rac*-TTX de Kishi y col.

La primera síntesis total de la tetrodotoxina (**1**), en su forma racémica, fue publicada por el grupo de Kishi en 1972 (Esquema II.4),¹⁰¹ ocho años después de la elucidación estructural del producto natural.

El paso clave en la preparación de su esqueleto carbonado consiste en la reacción de Diels-Alder catalizada por un ácido de Lewis (SnCl₄) de la oxima-quinona **II**, generada en dos etapas a partir del derivado aromático **I**,¹⁰² y butadieno (Esquema II.4). La regioselectividad de la reacción es dirigida por el carácter electrón-atractor de la oxima y da lugar a la *cis*-decalina **IV** como único aducto. Una transposición de Beckmann posterior permite instalar el nitrógeno de C-8a, que al final de la síntesis soportará el grupo guanidinio, generando la acetamida **V**.¹⁰³ La cicloadición [4+2] crea simultáneamente dos de los centros estereogénicos de la TTX (C-4a y C-8a) y la estructura cóncavo-convexa de la

¹⁰¹ (a) Kishi, Y.; Fukuyama, T.; Aratani, M.; Nakatsubo, F.; Goto, T.; Inoue, S.; Tanino, H.; Sugiura, S.; Kakoi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 9219-9222. (b) Kishi, Y.; Aratani, M.; Fukuyama, T.; Nakatsubo, F.; Goto, T.; Inoue, S.; Tanino, H.; Sugiura, S.; Kakoi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 9217-9219.

¹⁰² Kishi y col. utilizan 2-acetil-5-metilhidroquinona (**I**) preparada por acetilación de la toluhidroquinona de acuerdo al procedimiento descrito por Kurosawa (BF₃/AcOH), aunque no indican el rendimiento con el que la obtienen, ver: Kurosawa, E. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 300-304.

¹⁰³ (a) Kishi, Y.; Nakatsubo, F.; Aratani, M.; Goto, T.; Inoue, S.; Kakoi, H. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *59*, 5129-5132. (b) Kishi, Y.; Nakatsubo, F.; Aratani, M.; Goto, T.; Inoue, S.; Kakoi, H.; Sugiura, S. *Tetrahedron Lett.* **1970**, *59*, 5127-5128.

cis-decalina resultante permitirá controlar la estereoselectividad facial en la generación del resto de centros quirales oxigenados del ciclohexano (C-5, C-6, C-8 y C-9).

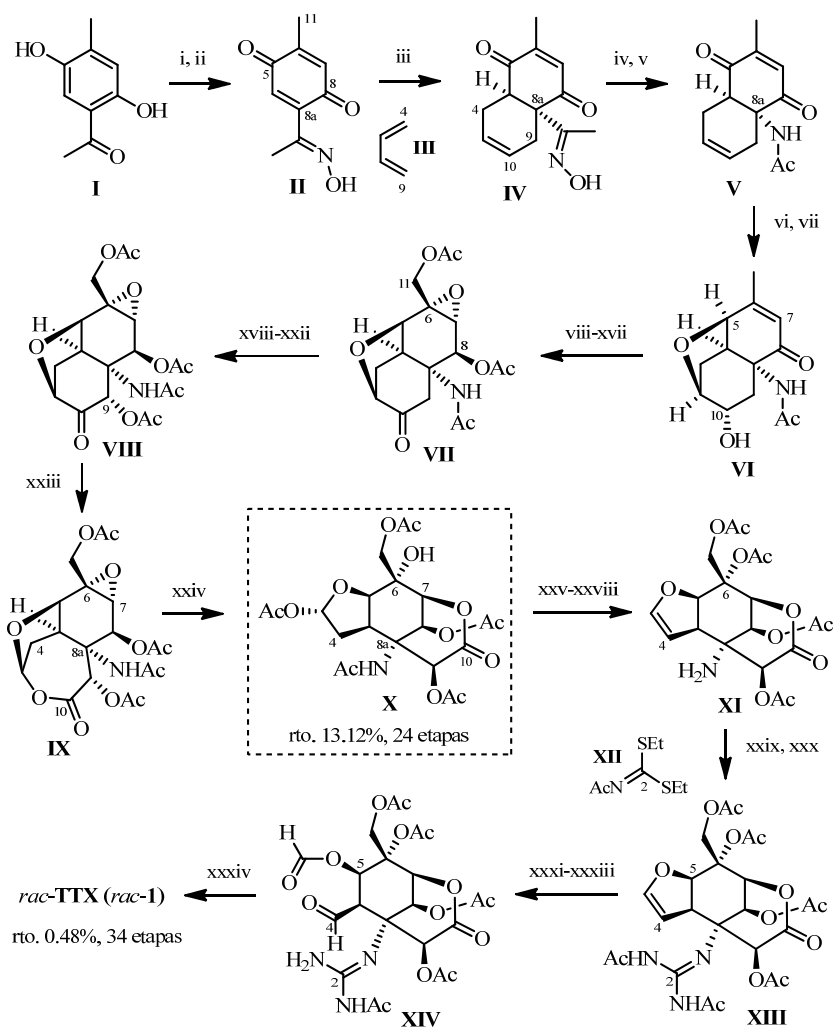
Así, mediante una serie de reacciones de reducción y epoxidación por la cara β de la molécula (más accesible),¹⁰⁴ se obtiene el intermedio **VIII** que incorpora los grupos oxigenados de C-5, C-6, C-8, C-9, C-10 y C-11 propios de TTX con la estereoquímica adecuada (rto. 33% en 17 etapas).

La reducción regio- y diastereoselectiva de la quinona **V** con NaBH₄ (por la cara convexa del sistema de *cis*-decalina), seguida de la epoxidación con *m*-CPBA de la olefina más rica en electrones (por su cara *exo*) y la apertura espontánea del epóxido por el ataque intramolecular del hidroxilo secundario, conduce al éter cíclico **VI** que presenta las posiciones C-5 y C-10 convenientemente oxigenadas (Esquema II.4).

A continuación, mediante la reducción estereoselectiva tipo Meerwein-Ponndorf-Verley de la cetona de C-8 por su cara α , la oxidación alílica de la posición C-11 con SeO₂ y epoxidación diastereoselectiva del doble enlace $\Delta^{6(7)}$ con *m*-CPBA, se obtiene el epóxido **VII** que incorpora la cadena de hidroximetilo de C-6.

Para completar la preparación del intermedio **VIII** se introduce el grupo acetoxi de la posición C-9 a través de una epoxidación diastereoselectiva del enol éter de la cetona **VII**, seguida de su tratamiento en medio ácido.

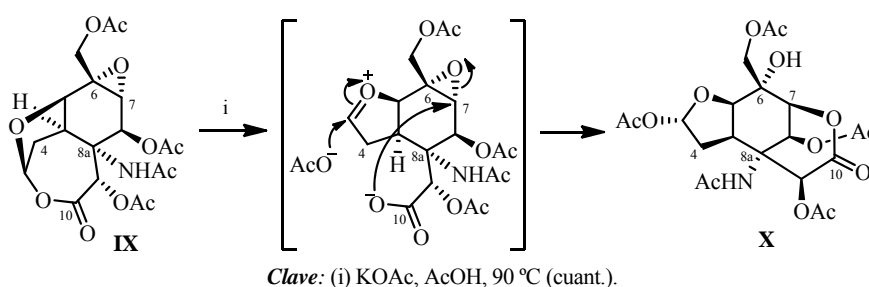
¹⁰⁴ En las estructuras de *cis*-decalina se llamará cara β a su cara convexa, es decir, a aquella por la que se encuentre el nitrógeno unido a C-8a. La cara α será la opuesta a la cara β .



Clave: (i) NH_2OH (92%); (ii) Ag_2O , Et_2O (86%); (iii) **III**, SnCl_4 , MeCN , t.a. (83%); (iv) MsCl , Et_3N (cuant.); (v) H_2O , 100 °C (61%); (vi) NaBH_4 , MeOH , 0 °C (96%); (vii) *m*-CPBA, CSA (75%); (viii) CrO_3 , $\text{py}/\text{H}_2\text{O}$, 50 °C (90%); (ix) $(\text{CH}_2\text{OH})_2$, $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, CH_2Cl_2 (cuant.); (x) $\text{Al}(\text{O}i\text{-Pr})_3$; (xi) Ac_2O , py (95%, 2 etapas); (xii) SeO_2 , xileno, 180 °C (cuant.); (xiii) NaBH_4 , $\text{MeOH}/1,4\text{-dioxano}$, 0 °C (cuant.); (xiv) *m*-CPBA, $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$, 90 °C (95%); (xv) Ac_2O , py (cuant.); (xvi) TFA, H_2O , 70 °C; (xvii) Ac_2O , py (80%, 2 etapas); (xviii) $\text{CH}(\text{OEt})_3$, EtOH , CSA, 80 °C; (xix) Ac_2O , py ; (xx) *o*-DCB, reflujo; (xxi) *m*-CPBA, K_2CO_3 , CH_2Cl_2 ; (xxii) AcOH (70%, 5 etapas); (xxiii) *m*-CPBA, CH_2Cl_2 , t.a. (cuant.); (xxiv) KOAc , AcOH , 90 °C (cuant.); (xxv) Ac_2O , CSA, 100 °C (cuant.); (xxvi) 290-300 °C, vacío (80%); (xxvii) $\text{Et}_3\text{O} \cdot \text{BF}_4$, Na_2CO_3 , CH_2Cl_2 ; (xxviii) Ac_2O , CH_2Cl_2 ; (xxix) **XII**, 120 °C; (xxx) AcNH_2 , 150 °C (20%, 4 etapas); (xxxi) NH_3 , $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$; (xxxii) OsO_4 , THF, -20 °C; (xxxiii) NaIO_4 , THF/ H_2O , 0 °C; (xxxiv) NH_3OH , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (25%, 4 etapas).

Esquema II.4. Síntesis de *rac*-TTX de Kishi y col.

La oxidación Baeyer-Villiger de la cetona **VIII** conduce a la ϵ -lactona **IX**, que después de un proceso de reordenamiento catalizado por el sistema KOAc/AcOH proporciona al esqueleto del ciclohexano hexasustituido **X**. Posiblemente, esta transformación tenga lugar a través de la formación de un ion oxonio y la consiguiente apertura de la lactona de siete miembros (Esquema II.5). Mientras que el ion oxonio es atacado por el acetato por su cara menos impedida, el carboxilato generado ataca intramolecularmente la posición oxiránica C-7, formando la correspondiente δ -lactona (ciclación 6-*exo-tet*).



Clave: (i) KOAc, AcOH, 90 °C (cuant.).

Esquema II.5. Mecanismo propuesto para la formación de la δ -lactona **X**.

El intermedio racémico **X** contiene todos los centros estereogénicos que presenta el *core* ciclohexánico de *rac*-TTX (**1**) y es obtenido con un 13.12% de rendimiento a partir de la hidroquinona **I** (24 etapas).

El resto de etapas se centran en ajustar el estado de oxidación de su carbono C-4 e incorporar el grupo guanidinio (Esquema II.4). Ambos procesos requieren la formación del dihidrofurano **XI** cuya amina sobre C-8a se encuentra libre. Por un lado, la aminación de la correspondiente isotiourea, obtenida por reacción de la amina con el ditiocarbonimidato **XII**, proporciona el derivado guanidínico **XIII**. Por otro, la posterior ruptura oxidativa del enol éter **XIII**, vía glicol, conduce al aldehído en C-4 **XIV**.

Finalmente, la amonolisis (NH_4OH) de todos los grupos protectores acetato induce la formación del ortoéster y hemiaminal cíclicos propios del producto natural. De esta forma, Kishi y col. completan la síntesis total del racémico de TTX (*rac*-**1**) en 34 etapas y con un rendimiento global del 0.48%.

F.1.2. Síntesis de (-)-TTX de Isobe y col.

En enero de 2003, 31 años después de que el grupo de Kishi completase la síntesis total de *rac*-TTX (*rac*-**1**), Isobe y col. publican la primera síntesis asimétrica de (-)-TTX (**1**) (Esquemas II.6 y II.7).¹⁰⁵

La síntesis comienza con la preparación en dos etapas del acetal **XVI** a partir de 2-acetoxi-tri-*O*-acetil-D-glucal (**XV**),¹⁰⁶ compuesto quiral que contiene uno de los futuros oxígenos de la TTX (Esquema II.6). Aunque el glucal **XV** elegido como sustrato de partida no posee ninguno de los centros estereogénicos presentes en el producto natural, la estereoquímica existente en C-4 participará en el control de la quiralidad de C-4a en posteriores transformaciones.

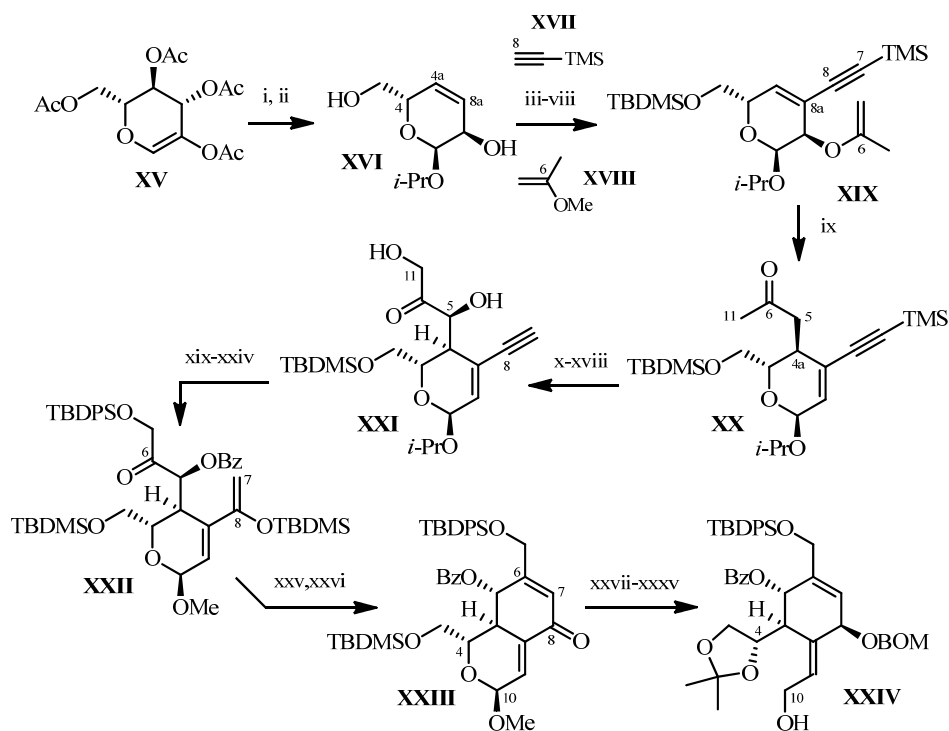
En este sentido, una transposición de Claisen del alil vinil éter **XIX**, obtenido en seis etapas desde el alcohol alílico **XVI** (incluido un acoplamiento de Sonogashira con el acetileno **XVII** en el que se introducen los carbonos C-7 y C-8), genera en C-4a el primero de los centros quirales propios de (-)-TTX (**1**).

Una vez preparada la metilcetona **XX**, una serie de reacciones de desprotección, oxidación y protección permite incorporar de forma regio- y estereoselectiva los grupos oxigenados de C-5, C-8 y C-11, dando lugar al silil

¹⁰⁵ Ohyabu, N.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8798-8805.

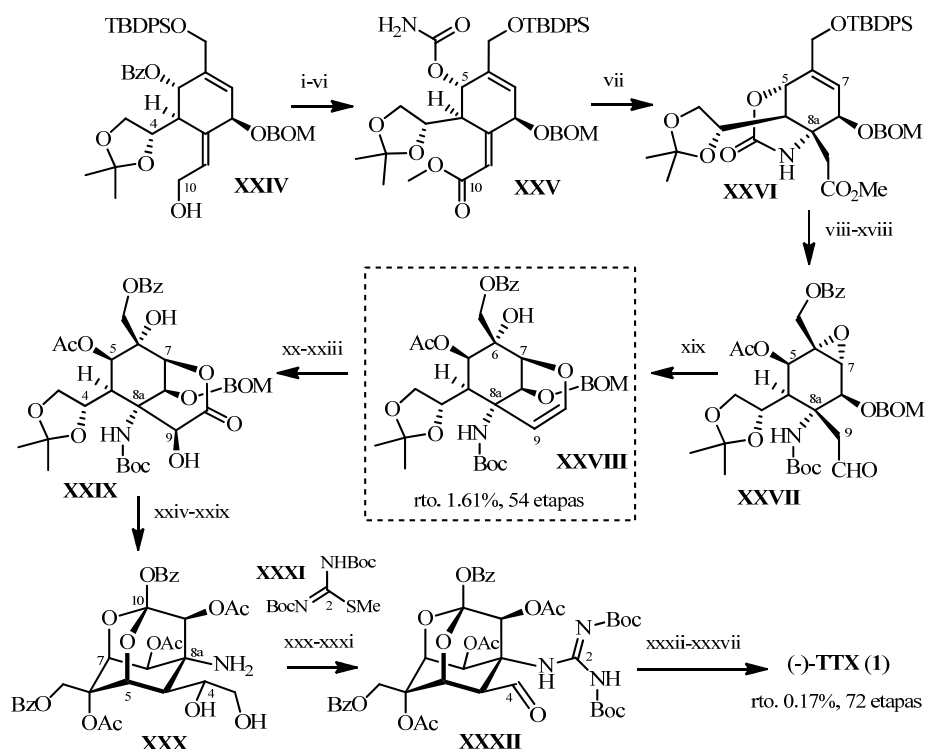
¹⁰⁶ (a) Ichikawa, Y.; Isobe, M.; Bai, D-L.; Goto, T. *Tetrahedron*, **1987**, *43*, 4737-4776. (b) El 2-acetoxi-D-glucal **XV** de partida lo generan a partir de D-glucosa en tres etapas (sin que indiquen su rendimiento químico): una peracetilación con $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$, la bromación de C-1 con HBr y su posterior deshidrobromación promovida por DBU [ver: Shafizadeh, F. en *Methods in Carbohydrate Chemistry*; Whistler, R.L.; Wolfram, M.L. Eds.; Academic Press: New York, 1963; p.409-410].

enol éter **XXII** (Esquema I.21). La posterior condensación aldólica intramolecular promovida por TBAF produce la ciclohexenona **XXIII**, con un 30% de rendimiento en 17 etapas (desde **XV**), la cual actúa como equivalente sintético del anillo carbonado de seis miembros del producto natural.



Clave: (i) *i*-PrOH, BF₃·OEt₂, C₆H₆ (63%); (ii) LiAlH₄, THF, 0 °C (cuant.); (iii) TBDMSCl, Et₃N, DMF (77%); (iv) SO₃·py, Et₃N, DMSO (93%); (v) I₂, py/CH₂Cl₂; (vi) NaBH₄, CeCl₃·(H₂O)₇, MeOH (85%, 2 etapas); (vii) **XVII**, Pd(OAc)₂, PPh₃, CuI, Et₃N, C₆H₆ (99%); (viii) **XVIII**, PPTS, THF (89%, 3 ciclos); (ix) K₂CO₃, *o*-DCB, 150 °C (94%); (x) TBDMSOTf, Et₃N; (xi) Pb(OAc)₄, KHCO₃; (xii) TBAF, THF/H₂O; (xiii) Et₃N, MeOH/H₂O (98%, 4 etapas); (xiv) SO₃·py, Et₃N, DMSO; (xv) MOMCl, (*i*-Pr)₂EtN; (xvi) NaBH₄, CeCl₃·(H₂O)₇, MeOH (84%, 3 etapas); (xvii) *m*-CPBA, K₂CO₃, CH₂Cl₂; (xviii) Amberlita-15, THF/H₂O (74%, 2 etapas); (xix) TBDPSCl, imidazol, DMF; (xx) BzCl, DMAP, py (81%, 2 etapas); (xxi) H₂SO₄, MeOH; (xxii) HgO (82%, 2 etapas); (xxiii) TBDMSOTf, Et₃N, 2,6-lutidina; (xxiv) TBDMSCl, imidazol, DMF; (xxv) TBAF, THF/H₂O; (xxvi) Cl₃CCOCl, DMAP, py (74%, 4 etapas); (xxvii) NaBH₄, CeCl₃·(H₂O)₇, MeOH/CH₂Cl₂ (92%); (xxviii) BOMCl, (*i*-Pr)₂EtN, DMAP, (CH₂Cl)₂; (xxix) CSA, MeOH; (xxx) Ac₂O, DMAP, py (95%, 3 etapas); (xxxi) HgO, PPTS, acetona/H₂O (88%, 3 ciclos); (xxxii) Mg(OEt)₂, AcOEt/MeOH (87%, 3 ciclos); (xxxiii) NaBH₄, MeOH; (xxxiv) Me₂C(OMe)₂, CSA, acetona; (xxxv) PPTS, MeOH (93%, 3 etapas).

Esquema II.6. Primera síntesis asimétrica de (-)-TTX de Isobe y col. (1ª parte).



Clave: (i) DIBAL-H; (ii) TEMPO, NCS; (iii) NaClO₂, NaH₂PO₄, Me₂C=CHMe/H₂O; (iv) TMSCHN₂ (78%, 4 etapas); (v) Cl₃CC(O)NCO, CH₂Cl₂; (vi) Et₃N, MeOH (99%, 2 etapas); (vii) KO^t-Bu, THF, -78 a -15 °C (90%); (viii) LiBH₄, THF; (ix) MMTTrCl, py (98%, 2 etapas); (x) Boc₂O, Et₃N, DMAP, THF; (xi) LiOH, MeOH/(CH₂Cl₂)₂/H₂O (84%, 2 etapas); (xii) *m*-CPBA, Na₂HPO₄, (CHCl₂)₂; (xiii) BzCl, Et₃N, CH₂Cl₂ (93%, 2 etapas); (xiv) Ac₂O, DMSO; (xv) NaBH₄, MeOH; (xvi) Ac₂O, py, DMAP (92%, 3 etapas); (xvii) TFA, MeOH; (xviii) IBX, DMSO (82%, 2 etapas); (xix) DBU, *o*-DCB, 130 °C; (xx) OsO₄, NMO, acetona/H₂O; (xxi) IBX, DMSO (68%, 3 etapas); (xxii) NaBH₄, MeOH (cuant.); (xxiii) Et₃N, MeOH; (xxiv) BzCl, Et₃N, py; (xxv) Ac₂O, DMAP (85%, 3 etapas); (xxvi) H₂, Pd(OH)₂-C, MeOH; (xxvii) Ac₂O, DMAP, py (96%, 2 etapas); (xxviii) TFA, MeOH; (xxix) CAN, MeOH, H₂O; (xxx) XXXI, HgCl₂, Et₃N, DMF (53%, 3 etapas); (xxxi) NaIO₄, MeOH, H₂O; (xxxii) TFA, MeOH (90%, 2 etapas); (xxxiii) HCl 4M, THF; (xxxiv) HCl 4M, MeOH/dioxano; (xxxv) Ac₂O, Et₃N, py (50%, 3 etapas); (xxxvi) Et₃N, MeOH/H₂O (85%); (xxxvii) TFA-*d* 2%, D₂O (65% TTX y 15% 4,9-anhidro-TTX).

Esquema II.7. Primera síntesis asimétrica de (-)-TTX de Isobe y col. (2ª parte).

Son necesarias nueve etapas más para formar el alcohol alílico **XXIV** (Esquema II.7), con un rendimiento del 62%, mediante la reducción con NaBH₄ de las posiciones C-8 y C-10 de la enona **XXIII** (la primera de ellas tiene lugar

estereoselectivamente por su cara β).¹⁰⁷

La introducción estereocontrolada del nitrógeno de C-8a se lleva a cabo mediante la adición conjugada intramolecular del carbamato nucleófilo anclado en C-5 sobre el éster α,β -insaturado del intermedio **XXV** (Esquema II.7).¹⁰⁸ Esta ciclación 6-*exo-trig*, promovida en medio básico (KO*t*-Bu), proporciona estereoespecíficamente la oxazolidinona **XXVI**.

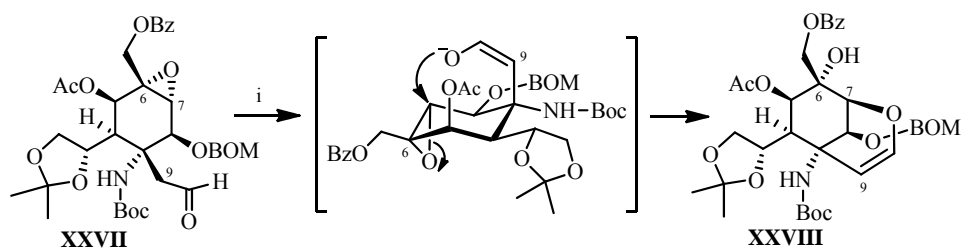
A continuación, se obtiene el epóxido **XXVII** mediante una secuencia de once pasos que incluyen: a) la hidrólisis del carbamato cíclico y protección de la amina resultante de C-8a como su *N*-Boc derivado; b) la epoxidación del doble enlace $\Delta^{6(7)}$ dirigida por el hidroxilo alílico de C-5 por la cara β de la molécula; c) la epimerización de C-5 para ajustar su configuración a la observada en la TTX; y d) la formación del aldehído en C-10.

Los dos últimos centros estereogénicos oxigenados del anillo de ciclohexano, C-6 y C-7, son instalados a través de la apertura del epóxido **XXVII** por ataque nucleófilo intramolecular (6-*exo-tet*) del enolato *Z* del aldehído C-10 (Esquema II.8). La α -cetohidroxilación formal del enol éter **XXVIII** conduciría a la δ -lactona **XXIX** con la posición C-9 convenientemente sustituida.

El intermedio **XXIX** contiene todos los centros estereogénicos que presenta el *core* ciclohexánico de (-)-TTX (**1**), con la configuración adecuada, y es obtenido con un 1.61% de rendimiento a partir del derivado de D-glucal **XV** (en 54 etapas).

¹⁰⁷ De ahora en adelante, en todas las estructuras que contengan el esqueleto ciclohexánico presente en la TTX (**1**), la cara β del anillo será aquella por la que se encuentre el nitrógeno unido a C-8a y se llamará cara α a la contraria.

¹⁰⁸ Inicialmente, Isobe y col. intentaron, sin éxito, introducir de forma estereocontrolada el nitrógeno de C-8a mediante una transposición de Overman del tricloroacetoimidato derivado del alcohol *exo*-alílico **X**. De hecho, cuando tratan el acetoimidato intermedio con K₂CO₃ en xileno a reflujo, aíslan únicamente la tricloroacetamida primaria procedente de su transposición sigmatrópica [1,3].



Clave: (i) DBU, *o*-DCB, 130 °C.

Esquema II.8. Proceso de apertura intramolecular del epóxido **XXVII**.

Los 15 pasos restantes son todas manipulaciones de grupos protectores a excepción de: a) la formación del ortoéster de la hidroxi- δ -lactona **XXIX**,¹⁰⁹ b) la instalación del grupo guanidinio por reacción de la amina **XXX** con la isotiourea **XXXI**; c) la ruptura oxidativa del 1,2-glicol que libera el aldehído en C-4, **XXXII**; y finalmente d) la generación del hemiaminal que conduce a (-)-TTX (**1**, Esquema II.7).¹¹⁰

En resumen, la síntesis total de (-)-TTX (**1**) se completa en 72 etapas desde el D-glucal **XV** con un rendimiento global del 0.17%. Para ello, Isobe emplea una gran variedad de grupos protectores, dedicando 33 etapas sintéticas a procesos de protección-desprotección. Además, la construcción del anillo de ciclohexano, precursor del esqueleto carbonado del producto natural, requiere 26 reacciones.

En 2004, Isobe y col. publicaron otra síntesis total de (-)-TTX (**1**), más eficiente y flexible que la anterior,¹¹¹ basada en una estrategia alternativa que

¹⁰⁹ La formación del ortoéster C-10 parece prevenir tanto la β -eliminación del hidroxilo de C-5, como la posible epimerización de C-9, durante las últimas etapas de la síntesis.

¹¹⁰ En realidad se obtiene una mezcla de TTX y 4,9-anhidro-TTX en una proporción [4:1], respectivamente. Isobe indica que ambas especies son separables por HPLC, empleando una columna de intercambio iónico y AcOH 0.05 N como eluyente, y que la forma 4,9-anhidro se puede transformar mayoritariamente en TTX mediante su tratamiento con TFA-*d* 2% en D₂O.

¹¹¹ (a) Urabe, D.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Chem. Asian. J.* **2006**, 1-2, 125-135. (b) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Isobe, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4782-4785.

emplea levoglucosenona (**XXXIII**)¹¹² como material de partida quiral. Esta nueva aproximación les permitió preparar, a partir de un intermedio sintético común,¹¹³ tanto TTX (**1**), como sus análogos desoxigenados: 5,11-didesoxitetrodotoxina, en 1999;¹¹⁴ 11-desoxitetrodotoxina, en 2002;¹¹⁵ y 8,11-didesoxitetrodotoxina, en 2002¹¹⁶ (Figura II.13).

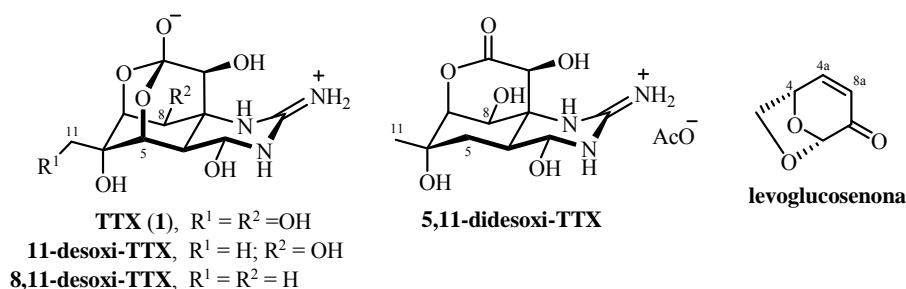


Figura II.13. Estructuras de los análogos de TTX sintetizados por Isobe y col. a partir de levoglucosenona (**XXXIII**).

El esqueleto ciclohexánico de TTX (incluido C-11) se construye mediante una reacción de Diels-Alder de la bromolevoglucosenona **XXXIV** e isopreno (**XXXV**), catalizada por un ácido de Lewis ($BF_3 \cdot OEt_2$), en la que se forma la 2-oxa-*cis*-decalina **XXXVI** como cicloadducto mayoritario (Esquema II.9).

¹¹² (a) Isobe, M.; Yamamoto, N.; Nishikawa, T. en *Levoglucosenone and Levoglucosans, Chemistry and Applications*; Witczak, Z.J. Ed.; ATL Press: 1994; p. 99-118. (b) Para la preparación de levoglucosenona por pirólisis de celulosa en medio ácido, ver: Shafizadeh, F.; Chin, P.P.S. *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 79-87.

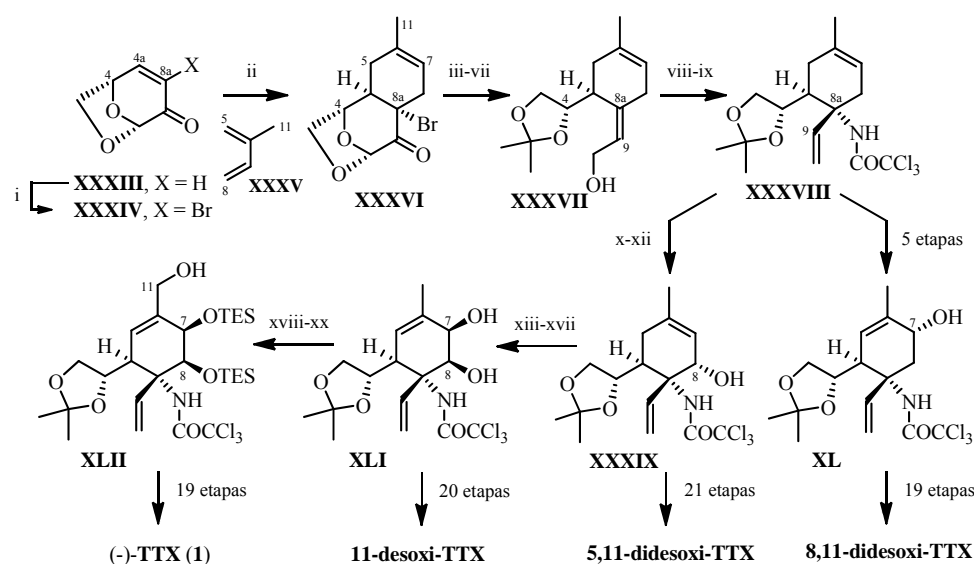
¹¹³ Nishikawa, T.; Asai, M.; Ohayabu, N.; Yamamoto, N.; Fukuda, Y.; Isobe, M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3875-3883.

¹¹⁴ (a) Asai, M.; Nishikawa, T.; Ohayabu, N.; Yamamoto, N.; Isobe, M. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 4543-4558. (b) Nishikawa, T.; Asai, M.; Ohayabu, N.; Yamamoto, N.; Isobe, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 3081-3084.

¹¹⁵ (a) Nishikawa, T.; Asai, M.; Isobe, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7847-7852. (b) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 251-257.

¹¹⁶ (a) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 452-462. (b) Nishikawa, T.; Urabe, D.; Yoshida, K.; Iwabuchi, T.; Asai, M.; Isobe, M. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2679-2682.

Posteriormente, una transposición de Overman del tricloroacetoimidato derivado del alcohol alílico **XXXVII** permite instalar el nitrógeno de C-8a de forma estereoselectiva (*anti* al resto acetónico de C-4a para minimizar la tensión alílica), generando la acetamida **XXXVIII** con un 32% de rendimiento desde **XXXIII** (9 etapas).¹¹⁷



Clave: (i) Br₂ y luego Et₃N (91%); (ii) **XXXV**, BF₃·OEt₂, MeCN, t.a. (76%); (iii) NaBH₄, MeOH; (iv) TFA, Ac₂O (85%, 2 etapas); (v) Zn-Cu, DMF/H₂O (81%); (vi) LiAlH₄, H₂O; (vii) Me₂C(OMe)₂, CSA, acetona (74%, 2 etapas); (viii) DBU, CCl₃CN, CH₂Cl₂, 0 °C; (ix) K₂CO₃, xileno, reflujo (90%, 2 etapas); (x) pyH·Br₃, K₂CO₃, CH₂Cl₂ (91%); (xi) DBU, DMF, t.a.; (xii) *p*-TsOH, py/H₂O, 70 °C (71%, 2 etapas); (xiii) *m*-CPBA, Na₂HPO₄, CH₂Cl₂ (96%); (xiv) Ti(Oi-Pr)₄, (CH₂Cl)₂, reflujo (90%); (xv) IBX, DMSO, 60 °C; (xvi) LiAlH (Or-Bu)₃, LiBr, THF, -78 °C; (xvii) NaBH₄, CeCl₃·(H₂O)₇, MeOH, -78 °C (80%, 3 etapas); (xviii) TESOTf, py, MeCN (86%); (xix) SeO₂, PNO, dioxano, reflujo; (xx) NaBH₄, CeCl₃·(H₂O)₇, MeOH, 0 °C (48%, 2 etapas).

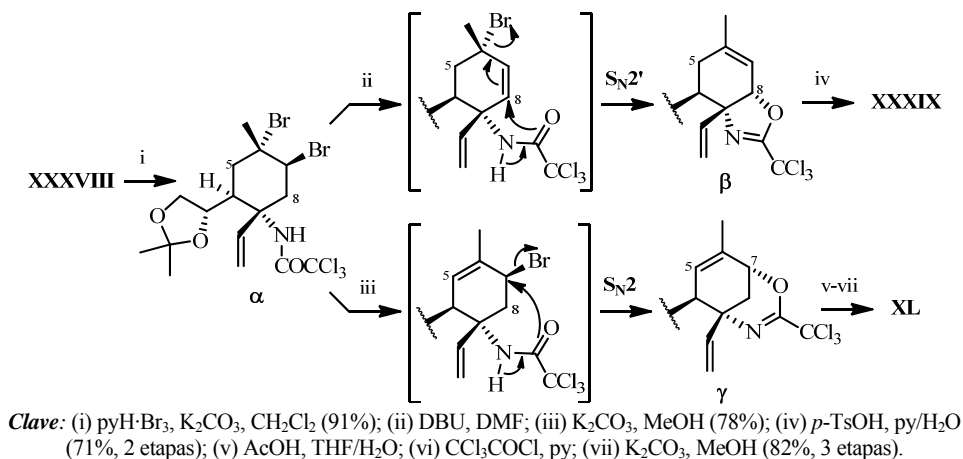
Esquema II.9. Síntesis de (-)-TTX y sus análogos a partir de levoglucosenona descrita por Isobe y col. (se muestran los intermediarios comunes).

La progresiva oxigenación regio- y estereoselectiva de las posiciones C-8, C-7 y C-11 del ciclohexeno **XXXVIII**, da lugar sucesivamente a los alcoholes

¹¹⁷ La acetamida **XXXVIII**, obtenida a partir de levoglucosenosa, es el intermedio sintético común de las síntesis de desoxi análogos de TTX desarrolladas por el grupo de Isobe (ver: Ref. 113).

XXXIX, **XLI** y **XLII**, que son utilizados como intermedios en la síntesis de los diferentes desoxi derivados de TTX, tal como se recoge en el Esquema II.9.

Asimismo, la bromación del doble enlace endocíclico de la acetamida **XXXVIII**, seguida de un proceso regioselectivo de deshidrobromación y ciclación intramolecular, permite acceder a los alcoholes alílicos **XXXIX** o **XL**, intermedios sintéticos de TTX (**1**) y 8,11-desoxi-TTX, respectivamente, dependiendo de las condiciones básicas empleadas en la etapa de eliminación (Esquema II.10).

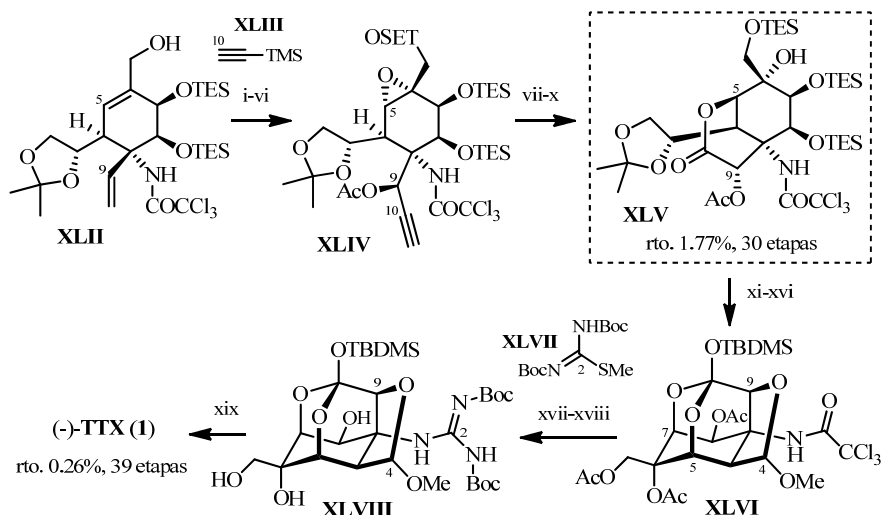


Esquema II.10. Mecanismo propuesto para la formación regio- y estereoselectiva de los alcoholes alílicos **XXXIX** y **XL**.

El tratamiento del dibromuro **α** con DBU en un disolvente aprótico como DMF, genera un bromuro alílico terciario (por abstracción de H-8) que sufre el ataque S_N2' intramolecular (5-*exo-trig*) del oxígeno del grupo acetamida de C-8a para dar lugar a la oxazolina **β** (Esquema II.10). La hidrólisis ácida de dicho imidato conduciría al alcohol en C-8, **XXXIX**. En cambio, cuando se trata el mismo dibromuro **α** con K_2CO_3 en un disolvente prótico como MeOH, se forma un bromuro alílico secundario (por abstracción de H-5) cuya reacción S_N2 (6-*exo-tet*) con el oxígeno nucleófilo de la amida proporciona la 1,3-oxazina **γ** (Esquema

II.10). En esta ocasión, la posterior hidrólisis en medio ácido libera el alcohol en C-7, **XL**.

La síntesis de (-)-TTX (**1**) continua, desde el alcohol **XXXIX**, con la preparación en ocho etapas del intermedio **XLII**, que incorpora los grupos hidroxilos de C-7, C-8 y C-11 con la estereoquímica apropiada (Esquema II.11).



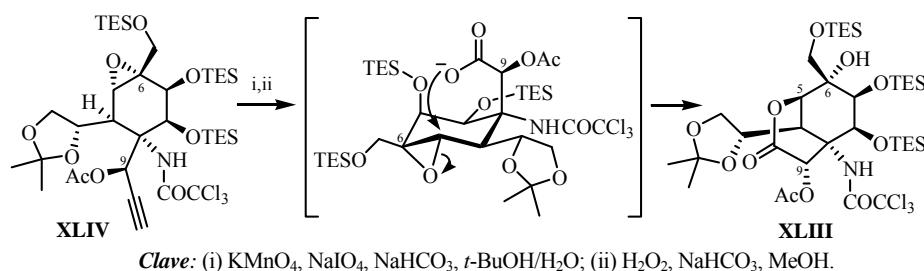
Clave: (i) TESOTf, 2,6-lutidina, CH₂Cl₂ (89%); (ii) *m*-CPBA, Na₂HPO₄, CH₂Cl₂ (89%); (iii) O₃, CH₂Cl₂, -78 °C; y luego Et₃N (90%); (iv) **XLIV**, EtMgBr, THF, 0 °C (70%); (v) Ac₂O, DMAP, py; (vi) TBAF, THF, -10 °C (92%, 2 etapas); (vii) KMnO₄, NaIO₄, NaHCO₃, *t*-BuOH/H₂O, 50 °C; (viii) H₂O₂, NaHCO₃, MeOH; (ix) TESOTf, 2,6-lutidina, CH₂Cl₂, -40 °C; (x) Ac₂O, py (64%, 4 etapas); (xi) TBAF, MeCN, 0 °C (75%); (xii) Ac₂O, py (94%); (xiii) H₅IO₆, AcOMe; (xiv) HC(OMe)₃, *p*-TsOH·H₂O, MeOH; (xv) NH₄OH, MeOH, 0 °C; (xvi) TBDMSOTf, 2,6-lutidina, CH₂Cl₂, 0 °C (55%, 4 etapas); (xvii) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -40 °C; (xviii) **XLVII**, HgCl₂, Et₃N, DMF (40%, 2 etapas); (xix) TFA/H₂O, t.a. (36% TTX y 58% 4,9-anhidro-TTX).

Esquema II.11. Segunda síntesis asimétrica de (-)-TTX de Isobe y col.
(a partir de levoglucosenona).

El alcohol alílico **XLII** es transformado en la δ -lactona **XLIII**, *core* ciclohexánico de TTX (**1**), siguiendo una secuencia análoga a la establecida previamente en la síntesis total de sus derivados desoxigenados (Esquema II.11). Dicha estrategia implica: a) una epoxidación estereoselectiva del doble enlace $\Delta^{5(6)}$ dirigida por el oxígeno alílico de C-7 por la cara β de la molécula; b) la

formación del centro estereogénico de C-9 mediante la ozonólisis del grupo vinilo y posterior adición estereoselectiva de acetiluro (**XVII**) sobre el aldehído resultante (se obtiene un alcohol propargílico que actuará como equivalente sintético del ácido carboxílico de C-10); y por último c) una lactonización por apertura intramolecular del epóxido **XLIV**.

En este sentido, la apertura del epóxido **XLIV** mediante un ataque nucleófilo intramolecular (6-*exo-tet*) del carboxilato C-10, generado por la ruptura oxidativa del resto acetileno, permite instalar correctamente los grupos oxigenados de C-5 y C-6 al formarse la δ -lactona **XLIII** (Esquema II.12).



Esquema II.12. Proceso de apertura intramolecular del epóxido **XLIV**
(vía ruptura oxidativa del acetileno sobre C-9).

Con la preparación del intermedio **XLIII**, con un 1.77% de rendimiento en 30 etapas desde levoglucosenona (**XXXIII**), se completa la síntesis del *core* ciclohexánico hexasustituido de (-)-TTX (**1**).

En la siguientes seis etapas, antes de introducir el grupo guanidina en C-8a, la δ -lactona **XLIII** se protege como el ortoéster sililado **XLVI**, que presenta un acetal intramolecular entre el hidroxilo de C-9 y el aldehído de C-4 (procedente de la ruptura oxidativa del glicol intermedio), para prevenir la epimerización de C-9 y la β -eliminación del hidroxilo de C-5 (Esquema II.11).

La desprotección reductora de la tricloroacetamida de **XLVI** por su tratamiento con DIBAL-H, seguida de la reacción de la correspondiente amina libre con la isotiourea **XXXI** en presencia de HgCl₂, proporciona el derivado guanidínico *N*-Boc protegido **XLVIII** (Esquema II.11).¹¹⁸ Finalmente, una última etapa de desprotección total en medio ácido (TFA/H₂O), en la que se forma espontáneamente el hemiaminal cíclico de C-4, da lugar a la (-)-TTX (**1**).¹¹⁹

De esta forma, Isobe y col. completan su segunda síntesis total de (-)-TTX (**1**) con un 0.26% de rendimiento global en 39 etapas, siendo más eficiente que la primera síntesis que publicaron en 2003. La elección de levoglucosenosa (**XXXIII**) como material de partida quiral y una optimización en la utilización de los grupos protectores, les permiten reducir a casi la mitad el número de etapas sintéticas, a la vez que duplican el rendimiento. Además, es una síntesis versátil que presenta intermediarios comunes con las síntesis totales de 5,11-didesoxi-TTX, 11-desoxi-TTX y 8,11-didesoxi-TTX, elaboradas por el grupo de Isobe en años anteriores, y da acceso a la preparación de otros desoxi análogos de interés empleando la misma estrategia.

¹¹⁸ Las últimas etapas de las síntesis de desoxi análogos de TTX elaboradas por Isobe y col., incluyendo la instalación del grupo guanidinio, formación del hemiaminal y, en especial, la desprotección de la tricloroacetamida de C-8a (la utilización de medio básico epimeriza C-9), resultaron ser las más complicadas. Así, en las síntesis de 5,11-didesoxi-TTX y 11-desoxi-TTX optaron por transformar el grupo tricloroacetamida en guanidina, pasando previamente por intermediarios tipo urea y carbodiimida, lo que requiere un número considerable de etapas. Más recientemente, en la síntesis de 8,11-didesoxi-TTX emplean un nuevo método de desprotección reductora de la tricloroacetamida con DIBAL-H, que requiere la formación del silil ortoéster de C-10, para después preparar la correspondiente guanidina en una única etapa por reacción de la amina libre con una isotiourea.

¹¹⁹ En esta ocasión, se obtiene una mezcla de TTX y 4,9-anhidro-TTX en una proporción [2:3], respectivamente. Isobe indica que ambas especies son separables por HPLC empleando una columna de intercambio iónico y que la forma 4,9-anhidro se puede transformar mayoritariamente en TTX mediante su tratamiento con TFA-*d* 1% en D₂O.

F.1.3. Síntesis de (-)-TTX de Du Bois y col.

En junio de 2003, apenas cinco meses después de que lo hiciera el grupo de Isobe, Du Bois y col. publicaron una nueva síntesis total asimétrica de (-)-TTX (**1**, Esquema II.13).¹²⁰ En esta aproximación, la estrategia utilizada para instalar los centros estereogénicos tetrasustituidos C-6 y C-8a del producto natural se basa en dos etapas de activación de enlaces C-H catalizadas por rodio, que implican la inserción de un carbeno y un nitreno, respectivamente.

El ácido D-isoascórbico (**XLIX**) elegido como material de partida quiral contiene estratégicamente dos de los centros estereogénicos de la (-)-TTX (C-6 y C-7), así como cuatro de sus ocho átomos de oxígeno. Además, la configuración de C-7 proporciona el estereocontrol necesario durante la reacción aldólica entre el oxalacetato **LII** y el aldehído **LI**, accesible desde **XLIX** en cinco etapas,¹²¹ para generar diastereoselectivamente la butenolida **LIII** (siendo la adición del enolato de **LII** *anti* al silil éter de **LI**). En este proceso se incorporan otros dos de los futuros oxígenos de la TTX, lo que reduce al mínimo el número de etapas de oxidación ha emplear a lo largo de la síntesis (Esquema II.13).

La formación del esqueleto carbonado ciclohexánico del producto natural se lleva a cabo empleando una reacción de inserción C-H intramolecular de un carbeno de rodio¹²² derivado de la α -diazocetona **LIV**, obtenida en cuatro etapas desde el éster bencílico **LIII** por adición de diazometano (Esquema II.13). La

¹²⁰ Hinman, A.; Du Bois, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11510-11511.

¹²¹ La amida **LXXVIII** (Esquema I.28), sustrato de partida de la síntesis en la publicación original y precursor directo del aldehído **LXXIX**, es preparada por Du Bois y col. a partir del ácido D-isoascórbico (**LXXVII**) en cuatro etapas (vía γ -lactona del ácido D-eritrónico), aunque no especifican ni las condiciones de reacción empleadas ni los rendimientos obtenidos [ver: (a) Carreira, E.M.; Du Bois, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8106-8125. (b) Cohen, N.; Banner, B.L.; Lopresti, R.J.; Wong, F.; Rsosenberg, M.; Liu, Y-Y.; Thom, E.; Liebmann, A.A. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 3661-3672].

¹²² Para una revisión bibliográfica reciente sobre la inserción de carbenos metálicos a enlaces C-H, ver: Davies, H.M.L.; Beckwith, R.E.J. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2861-2903.

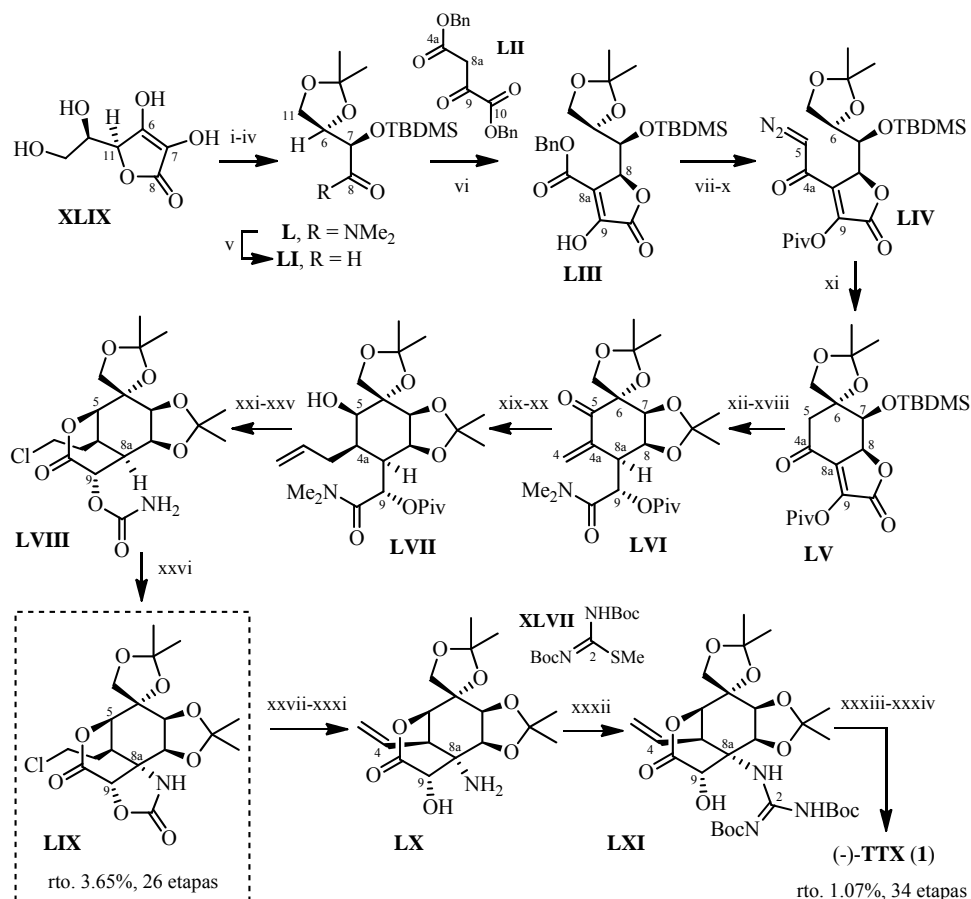
descomposición del grupo diazo de C-5 catalizada por un complejo Rh-acetamida ($\text{Rh}_2(\text{HNCOCPh}_3)_4$) da lugar, exclusivamente, a la ciclohexanona **LV** con retención de la configuración del carbono tetrasustituido C-6.

A partir de la ciclohexanona **LV** se prepara la δ -lactona **LVIII**, que incorpora en C-9 el carbamato primario requerido para la posterior aminación de C-8a (Esquema II.13), mediante una secuencia de catorce etapas que implican: a) una hidrogenación selectiva del doble enlace $\Delta^{8a,9}$ por la cara convexa de la butenolida **LV**; b) una olefinación tipo Tebbe ($\text{Zn}/\text{TiCl}_4/\text{CH}_2\text{I}_2$)¹²³ en la que se introduce el carbono C-4, seguida de la oxidación alílica de C-5, proporciona la cetona α,β -insaturada **LVI**; y c) a través de la adición conjugada de un vinil cuprato sobre **LVI** y la reducción de la cetona intermedia, ambas de forma diastereoselectiva, se obtiene el alcohol **LVII**, cuya lactonización está facilitada por la disposición axial del hidroxilo nucleófilo de C-5 (único oxígeno de TTX introducido por oxidación). En todas estas transformaciones, la conformación cóncavo-convexa de los sistemas bicíclicos tipo *cis*-perhidroindano generados, como la butenolida inicial **LV** o el 7,8-acetonido **LVI** intermedio, controla la estereoselectividad observada en la instalación de los centros estereogénicos C-4a, C-5, C-8a y C-9 del anillo de ciclohexano.

Como ya se ha apuntado, la aminación de C-8a se lleva a cabo mediante un proceso de inserción C-H intramolecular del nitreno de rodio generado mediante el tratamiento oxidativo ($\text{PhI}(\text{OAc})_2/\text{MgO}$), catalizado por un complejo Rh-acetamida ($\text{Rh}_2(\text{HNCOCF}_3)_4$), del correspondiente carbamato **LVIII**.¹²⁴ La inserción del nitreno en el enlace C-H del metino C-8a es estereoespecífica, dando lugar a la oxazolidinona **LIX** con retención de su configuración (Esquema II.13).

¹²³ Takai, K.; Kakiuchi, T.; Kataoka, Y.; Utimoto, K. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2668-2670.

¹²⁴ Sobre la metodología desarrollada por el grupo de Du Bois para la conversión de carbamatos a oxazolidinonas mediante una reacción de inserción C-H catalizada por Rh(II), ver: Espino, C.G.; Du Bois, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 598-600.



Clave: (i) H_2O_2 , K_2CO_3 ; y luego HCl ; (ii) Me_2NH , MeOH ; (iii) $(\text{MeO})_2\text{CMe}_2$, $p\text{-TsOH}$; (iv) Sililación (no aportan datos); (v) DIBAL-H , $n\text{-BuLi}$, THF/hexano ; (vi) **LII**, NaOAc , THF ; (vii) $t\text{-BuCOCl}$, py , THF (85%, 3 etapas); (viii) H_2 , Pd-C , THF (88%); (ix) $(\text{COCl})_2$, DMF , THF ; (x) CH_2N_2 , CH_2Cl_2 (63-70%, 2 etapas); (xi) $\text{Rh}_2(\text{HNCOCPh}_3)_4$ 1.5% mol, CCl_4 ; (xii) $\text{NH}_3\cdot\text{BH}_3$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75%, 2 etapas); (xiii) H_2 (1200 psi), Rh-C 5% mol, TFA/MeOH ; (xiv) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, $p\text{-TsOH}$, THF (77%, 2 etapas); (xv) Me_2NH , THF (83%); (xvi) $(n\text{-Pr}_4\text{N})\text{RuO}_4$, NMO , tamiz 4\AA , CH_2Cl_2 (94%); (xvii) Zn , TiCl_4 , CH_2Cl_2 , PbCl_2 cat., THF (72%); (xviii) Ph_2Se_2 , PhIO_2 , py , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$, 100°C (70%); (xix) $\text{H}_2\text{C}=\text{CHMgBr}$, CuI , THF ; (xx) $t\text{-BuNH}_2\cdot\text{BH}_3$, $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ (77%, 2 etapas); (xxi) $t\text{-BuCO}_2\text{H}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$, 200°C ; (xxii) NaOMe , THF/MeOH (78%, 2 etapas); (xxiii) $\text{Cl}_3\text{CC}(\text{O})\text{NCO}$, CH_2Cl_2 ; y luego Zn , MeOH (93%); (xxiv) O_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; y luego NaBH_4 (83%); (xxv) MsCl , py , $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$ (86%); (xxvi) $\text{Rh}_2(\text{HNCOCF}_3)_4$ 10% mol, $\text{PhI}(\text{OAc})_2$, MgO , C_6H_6 , 65°C (77%); (xxvii) NaSePh , THF/DMF (77%); (xxviii) $m\text{-CPBA}$, py , $(\text{CH}_2\text{Cl})_2$, 55°C (92%); (xxix) Boc_2O , Et_3N , DMAP , THF ; (xxx) K_2CO_3 , THF/MeOH , 84% (2 etapas); (xxxi) H_2O , 110°C (95%); (xxxii) **XLII**, HgCl_2 , Et_3N , $\text{MeCN}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (80%); (xxxiii) O_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$; y luego Me_2S ; (xxxiv) $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$ (65%, TTX y 4,9-anhidro- TTX [1:1 \rightarrow 4:1]).

Esquema II.13. Síntesis asimétrica de (-)-TTX de Du Bois y col.

El intermedio **LIX**, obtenido con un 3.65% de rendimiento a partir de la amida **L** (26 etapas), contiene todos los centros estereogénicos que presenta el *core* ciclohexánico de (-)-TTX (**1**).

Una vez introducido el nitrógeno N-1 sobre C-8a, la hidrólisis del carbamato cíclico de **LIX** libera el correspondiente amino-alcohol **LX**, cuyo tratamiento con la isotiourea **XXXI** en presencia de HgCl₂ conduce al derivado guanidínico *N*-Boc protegido **LXI** (Esquema II.13).

Por último, la obtención del aldehído de C-4 por ozonólisis del grupo vinilo de **LXI**, seguida de una desprotección general en medio ácido (TFA/H₂O), promueve la formación del hemiaminal cíclico (en el que participa la guanidina) y del ortoéster (que conforma la estructura de dioxaadamantano) característicos de TTX (**1**).¹²⁵ Con ello, Du Bois y col. completan la síntesis total de (-)-TTX (**1**) en 34 etapas a partir del ácido D-isoascórbico (**XLIX**), con un rendimiento global de 1.07% desde la amida **L**.¹²⁶

F.1.4. Síntesis de *rac*-TTX de Sato y col.

En 2005, Sato y col. completaron una nueva síntesis total del racémico de TTX (*rac*-**1**) empleando como sustrato de partida *mio*-inositol (**LXII**),¹²⁷ compuesto *meso* cuyo esqueleto de ciclohexano hexahidroxilado comparte tres centros estereogénicos (C-5, C-7 y C-8) con el producto natural (Esquema II.14).¹²⁸

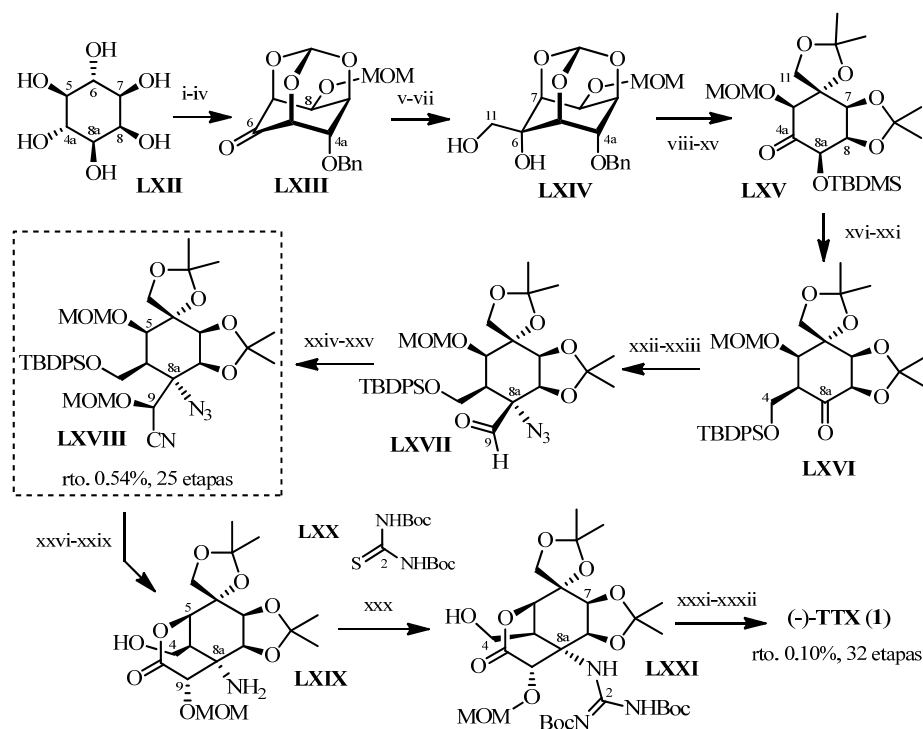
¹²⁵ Finalmente, Du Bois obtiene una mezcla equimolecular de (-)-TTX (**1**) y 4,9-anhidro-TTX que, según indica, puede ser enriquecida en TTX, hasta una proporción [4:1], si se mantiene en medio ácido acuoso (TFA/H₂O) durante cinco días.

¹²⁶ Los autores no aportan datos sobre el rendimiento de las cuatro primeras etapas de la síntesis, en las cuales preparan la amida **LXXVIII** a partir de ácido isoascórbico (**LXXVII**).

¹²⁷ Sato, K.; Akai, S.; Sugita, N.; Ohsawa, T.; Kogure, T.; Shoji, H.; Yoshimura, J. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 7496-7504.

¹²⁸ Por otro lado, Sato y col. han empleado una estrategia similar en una aproximación sintética a la (-)-TTX (**1**) enantioméricamente pura que parte de D-glucosa, ver: Sato, K.; Kajihara, Y.; Nakamura, Y.; Yoshimura, J. *Chem. Lett.* **1991**, 1559-1562.

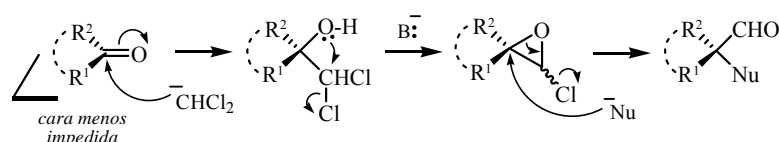
La estrategia empleada para incorporar sucesivamente los centros estereogénicos C-6, C-4a y C-8a, con la sustitución y estereoquímica propia de TTX (**1**), implica la oxidación a cetona de los hidroxilos de dichas posiciones y su homologación posterior por adición estereocontrolada del nucleófilo adecuado.



Clave: (i) $\text{CH}(\text{OEt})_3$, *p*-TsOH, DMF (70%); (ii) NaH, BnBr, DMF (81%); (iii) MOM-Cl, *i*-Pr₂EtN, CH_2Cl_2 (74%); (iv) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et₃N, CH_2Cl_2 (cuant.); (v) LDA, CH_2Cl_2 (76%); (vi) *n*-Bu₄NOH, DMSO; (vii) NaBH₄, MeOH (81%, 2 etapas); (viii) NaH, BnBr, DMF (89%); (ix) HCl 0.1M, MeOH (97%); (x) TBDMSCl, imidazol, DMF (62%); (xi) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, PPTS, CH_2Cl_2 (93%); (xii) $\text{CH}_2(\text{OMe})_2$, P₂O₅, CH_2Cl_2 (75%); (xiii) H₂, Pd(OH)₂-C 10%, EtOH (88%); (xiv) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, PPTS, CH_2Cl_2 (99%); (xv) $(\text{COCl})_2$, DMSO, Et₃N, CH_2Cl_2 (95%); (xvi) TMSCH₂MgCl, Et₂O (63%); (xvii) NaH, THF (79%); (xviii) BH₃-THF, NaOH aq.; y luego H₂O₂ aq.; (xix) TBAF, CH_2Cl_2 (74%, 2 etapas); (xx) TBDPSCl, imidazol, DMF (99%); (xxi) peryodinato Dess-Martin, CH_2Cl_2 (99%); (xxii) LDA, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{THF}$ (79%); (xxiii) NaN₃, 15-corona-5, DMSO (63%); (xxiv) TMSCN, Et₃N, MeOH (45% y 29% de 9-*epi*); (xxv) $\text{CH}_2(\text{OMe})_2$, P₂O₅, CH_2Cl_2 (93%); (xxvi) DIBAL-H, CH_2Cl_2 (87%); (xxvii) CrO₃-H₂SO₄, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acetona}$ (90%); (xxviii) H₂, Pd-C 10%, EtOH (cuant.); (xxix) TBAF, THF (90%); (xxx) LXX, HgCl₂, Et₃N, DMF (72%); (xxxi) PCC, CH_2Cl_2 ; (xxxii) a) HCl 4 M, dioxano; b) TFA 30%, H₂O; c) AcOH 4%, H₂O (30% TTX y 5% 4,9-anhidro-TTX, 2 etapas).

Esquema II.14. Síntesis de *rac*-TTX de Sato y col.

En este sentido, la adición estereoselectiva del diclorometil-litio a las cetonas en C-6 y C-8a por su cara menos impedida, seguida de la apertura regioselectiva del espiro- α -cloroepóxido intermedio por el ataque nucleófilo de un hidróxido o una azida, respectivamente, conduciría a los correspondientes α -hidroxialdehído y α -azidoaldehído homólogos (Esquema II.15).¹²⁹



Esquema II.15. Método general de homologación de cetonas, vía espiro- α -cloroepóxidos, desarrollado por Sato y col.

La síntesis comienza con una reacción de 1,3,5-ortoformilación del *meso*-inositol **LXII** (Esquema II.14), que fija la conformación del anillo de ciclohexano y permite diferenciar los tres grupos hidroxilos libres restantes para obtener la cetona **LXIII** en cuatro etapas.

La cadena de hidroximetilo sobre C-6 se introduce mediante la adición estereoselectiva del anión del diclorometano (LDA/CH₂Cl₂) a la cetona **LXIII**, seguido del tratamiento con *n*-Bu₄NOH del derivado α -hidroxi-diclorometilo intermedio (Esquema II.15).¹³⁰ La reducción del aldehído generado con NaBH₄ proporciona el 1,2-diol **LXIV** como un único estereoisómero (Esquema II.14).

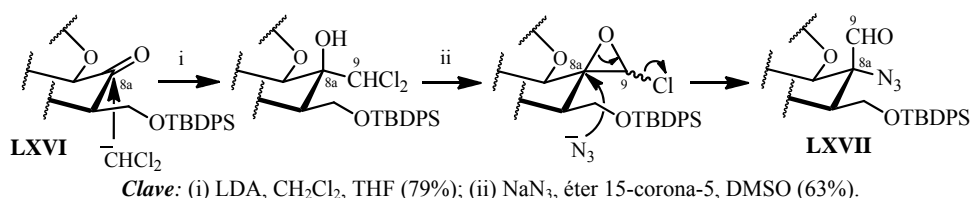
A partir del trioxaadamantano **LXIV**, son necesarias catorce etapas para incorporar el carbono C-4 de TTX (Esquema II.14). Las ocho primeras se emplean

¹²⁹ Sobre la preparación y aplicaciones de espiro- α -cloroepóxidos, ver: (a) Sato, K.; Sekiguchi, T.; Hozumi, T.; Yamazaki, T.; Akai, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 3087-3090. (b) Sato, K.; Suzuki, K.; Ueda, M.; Katayama, M.; Kajihara, Y. *Chem. Lett.* **1991**, 1469-1472.

¹³⁰ Sobre la metodología desarrollada por el grupo de Sato para preparar α -hidroxialdehídos a partir de α -hidroxidiclorometil derivados de cetonas, ver: (a) Sato, K.; Suzuki, K.; Ueda, M.; Kajihara, Y.; Hori, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 225-230. (b) Sato, K.; Yamamoto, Y.; Hori, H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 2799-2800. (c) Sato, K.; Suzuki, K.; Hashimoto, Y. *Chem. Lett.* **1995**, 83-84.

para obtener la ciclohexanona **LXV** mediante una serie de manipulaciones de grupos protectores y la oxidación selectiva del alcohol de C-4a. Las seis siguientes, incluidas una olefinación de tipo Peterson, la posterior hidroborcación del doble enlace generado y la oxidación de C-8a, implican la formación de la ciclohexenona **LXVI**, que presenta una cadena de hidroximetilo como precursor del aldehído C-4.

La ciclohexenona **LXVI** reacciona con LDA en diclorometano generando estereoselectivamente el correspondiente 2,2-dicloroetanol derivado (Esquema II.16), produciéndose el ataque nucleófilo del anión por la cara menos impedida del carbonilo de C-8a (*anti* a los oxígenos 1,3-diaxiales de C-3 y C-5). La formación del espiro- α -cloroepóxido y su posterior apertura por adición regioselectiva de un anión azida, dan lugar al α -azidoaldehído **LXVII** que incorpora el nitrógeno N-1 sobre C-8a.



Esquema II.16. Preparación estereoselectiva del α -azido-aldehído **LXVII** desde la ciclohexenona **LXVI** (a través de un α -cloroepóxido espiránico intermedio).

La reacción del aldehído **LXVII** con TMSCN/Et₃N genera de forma estereoselectiva la cianhidrina **LXVIII** termodinámicamente más estable, incorporando el futuro carbono carboxílico C-10 como un grupo ciano (Esquema II.14). Dicha cianhidrina contiene todos los centros estereogénicos del *core* ciclohexánico de *rac*-TTX (incluido C-9) con la stereoquímica correcta y es obtenida a partir de *mio*-inositol (**LXII**) con un rendimiento de 0.54% en 25 etapas.

Tras una serie de reacciones de reducción y desprotección, se obtiene la

δ -lactona **LXIX** que posee una amina libre en C-8a y cuyo tratamiento con la tiourea **LXX** en presencia HgCl_2 y Et_3N permite incorporar el grupo guanidinio de **LXXI** (Esquema II.14).

Para terminar, después de generar el aldehído en C-4 por oxidación del alcohol **LXXI** con PCC, la desprotección general en medio ácido conlleva la formación tanto del hemiaminal como del ortoéster presentes en la TTX (**1**, Esquema II.14).¹³¹ De este modo, Sato y col. completan la síntesis total del *rac*-TTX (*rac*-**1**) con un rendimiento global del 0.10% en 32 etapas, siendo mucho menos eficiente que la síntesis diseñada por el grupo de Kishi 33 años antes.

F.2. Tabla-Resumen de las Síntesis Totales de TTX

A modo de resumen, en la Tabla II.7 se recogen los aspectos sintéticos más significativos de las cinco síntesis totales de TTX (**1**) publicadas hasta la fecha. Todas ellas son secuencias largas (32-72 etapas) y siguen una estrategia lineal. Además, la eficiencia de la síntesis de *rac*-TTX de Kishi y col. (rto. global de 0.48%) sólo es superada por la aproximación a la (-)-TTX enantioméricamente pura desarrollada por el grupo de Du Bois (rto. global de 1.07%).

Actualmente, debido a su actividad farmacológica y potencial aplicación terapéutica ha aumentado el interés por elaborar una síntesis total de TTX (**1**) alternativa, rentable y eficiente, que: a) por un lado, permita acceder a nuevos análogos (naturales o no), tanto racémicos como enantioméricamente puros, útiles para estudiar su actividad biológica; y b) por otro, pueda ser utilizada para la producción industrial de TTX, ya que ésta se aísla en pequeñas cantidades y su fuente natural (algunas especies de peces globo)¹³² es de difícil renovación.

¹³¹ Finalmente, se aísla una mezcla de *rac*-TTX y *rac*-4,9-anhidro-TTX en una proporción [3:1], respectivamente.

¹³² Para extraer ~ 90 mg de TTX (**1**) son necesarios entre 45 y 90 Kg de ovarios de algunas especies de pez globo del género *Takifugu*.

<i>Síntesis</i>	<i>rac</i> -TTX	(-)-TTX	(-)-TTX	(-)-TTX	<i>rac</i> -TTX
<i>Autor</i>	Kishi y col.	Isobe y col.	Isobe y col.	Du Bois y col.	Sato y col.
<i>Referencia</i>	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 1972 , 94, 9217-9222.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2003 , 125, 8798-8805.	<i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> 2004 , 43, 4782-4785.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2003 , 125, 11510-11511.	<i>J. Org. Chem.</i> 2005 , 70, 7496-7504.
<i>Nº etapas</i>	34	72	39	34	32
<i>Rto. global</i>	0.48%	0.17%	0.26%	1.07% (30 etapas)	0.10%
<i>Sustrato de partida</i>	5-acetilulhidroquinona	2-acetoxi-tri- <i>O</i> -acetil-D-glucal	levoglucososa	ácido D-isoascórbico	<i>misio</i> -inositol
<i>Aspectos clave de la síntesis</i>	<ul style="list-style-type: none">• Generación del esqueleto ciclohexánico mediante una reacción Diels-Alder.• Control cíclico en la formación de 6 centros estereogénicos.• Introducción del N de C-8a por una transposición de Beckmann.• Instalación del centro cuaternario C-6 mediante una apertura de epóxido intramolecular promovida por un carboxilato.• Fuente guanidina: ditiocarbonimidato• Sólo grupos protectores acetilo y cetal.	<ul style="list-style-type: none">• Formación del esqueleto ciclohexánico siguiendo la secuencia: acoplamiento Sonogashira, transposición de Claisen y condensación aldólica intramolecular.• Introducción del N de C-8a por adición conjugada intramolecular de un carbamato sobre un éster α,β-insaturado.• Instalación del centro cuaternario C-6 mediante una apertura de epóxido intramolecular promovida por un enolato.• Fuente guanidina: isotiourea• 33 etapas de manipulación de grupos protectores.	<ul style="list-style-type: none">• Generación del esqueleto ciclohexánico mediante una reacción Diels-Alder.• Introducción del N de C-8a (protegido como tricloacetamida) por una transposición de Overman.• Utilización de un acetileno como equivalente sintético de ácido carboxílico.• Instalación del centro cuaternario C-6 mediante una apertura de epóxido intramolecular promovida por un carboxilato.• Fuente guanidina: isotiourea• Esta estrategia permite sintetizar desoxi análogos desde un intermedio común.	<ul style="list-style-type: none">• Inserción de carbonos y nitrenos a enlaces C-H no activados utilizando Rh como catalizador.• Formación del esqueleto ciclohexánico y el centro cuaternario C-6 mediante una adición aldólica de oxalacetato, seguida de la inserción intramolecular de un Rh-carbeno.• Introducción del N de C-8a por inserción intramolecular de un Rh-nitreno.• O-5 es el único oxígeno introducido por oxidación.• Aldelído C-4 enmascarado como grupo vinilo.• Fuente guanidina: isotiourea	<ul style="list-style-type: none">• Esqueleto ciclohexánico incorporado en el sustrato.• Ortoformilación inicial permite la desimetrización del compuesto <i>meso</i>.• Generación de los centros cuaternarios C-6 y C-8a mediante la apertura regio- y estereoselectiva del correspondiente espiro α-cloroepóxido derivado (equivalente sintético de hidroximetilo) promovida por un hidroxido (OH en C-6) o una azida (N en C-8a), respectivamente.• Introducción de C-4 vía olefinación de Peterson y de C-9 como cianhidrina.• Fuente guanidina: tiourea

Tabla I L.7. Síntesis Totales de Tetrodotoxina (TTX, 1) publicadas hasta la fecha.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

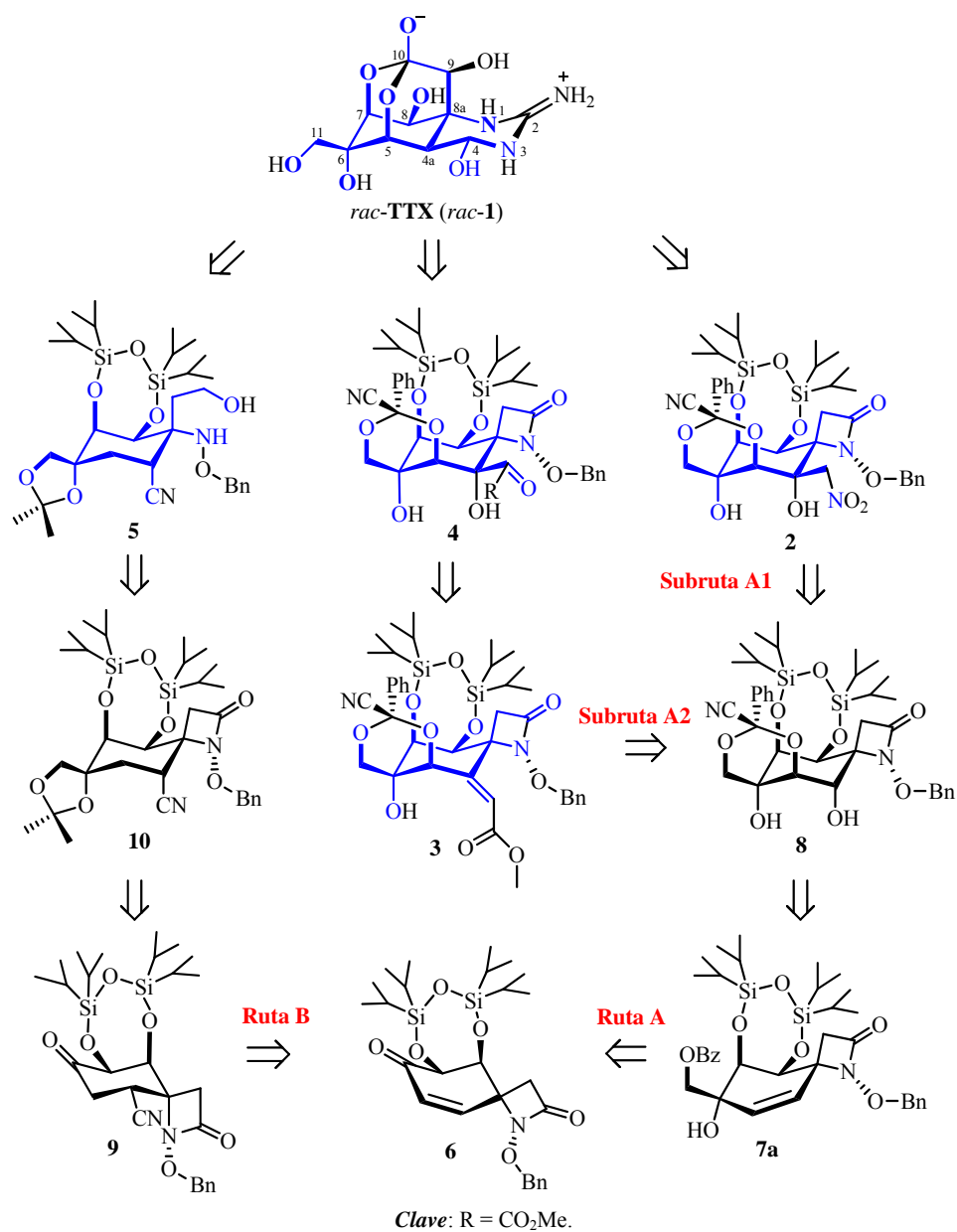
OBJETIVOS

Los **objetivos prácticos** de la presente Memoria consisten en desarrollar:

1. *Estudio de mercado de la tetrodotoxina y sus análogos.*
 - 1.1. El Mercado de la Salud.
 - 1.2. El Mercado de la Seguridad y la Defensa.
2. *Síntesis total de los análogos de tetrodotoxina siguientes (Esquema I).*
 - 2.1. Síntesis del nitroalcohol **2**.
 - 2.2. Síntesis del alqueniléster **3**.
 - 2.3. Síntesis del α -cetoéster **4**.
 - 2.4. Síntesis del aminoalcohol **5**.

PLAN DE TRABAJO

Ya que el objetivo práctico sintético de la Memoria consiste en la preparación de análogos sintéticos del *core* de la tetrodotoxina, el desarrollo del Esquema I lleva implícito el detallado plan de trabajo sintético que consiste en la preparación concatenada de cada uno de los compuestos indicados en el orden señalado en dicho Esquema.



Esquema I. Esquema retrosintético de *rac*-TTX (*rac*-1)
(se resalta en color azul el core de TTX).

La síntesis de todos los análogos que conllevan el *core* de *rac*-TTX se realizará a partir de la ciclohexenona **6**, cuyo esqueleto carbonado es precursor de ocho (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9 y C-10) de los once carbonos presentes en *rac*-TTX y con las posiciones C-7(*S**) y C-8(*S**) oxigenadas en *anti* al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en *rac*-TTX.

La preparación del nitroalcohol **2**, del alquenciléster **3** y del α -cetoéster **4**, se llevará a cabo mediante el desarrollo de la ruta sintética A. Por su parte, para la preparación del aminoalcohol **5**, se llevara a cabo mediante el desarrollo de la ruta sintética B.

Ruta A: Incorpora inicialmente el carbono C-11 y después el carbono C-4 (ruta A, Esquema I).

A partir de las ciclohexenona **6**, se introducirán de forma estereocontrolada, el carbono convenientemente oxigenado C-11 y el grupo hidroxilo de C-6(*R**), mediante una secuencia que implica una reacción de Wittig, dihidroxilación regioselectiva del dieno resultante y posterior protección del alcohol primario. El benzoato **7a** presenta, por su parte nueve (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos de *rac*-TTX.

La preparación del cianobenciliden acetal **8** se realizará mediante una secuencia que implica dos etapas: i) epoxidación diastereoselectiva del benzoato **7a** y ii) apertura intramolecular regioselectiva del epóxido. De esta manera, se consigue la introducción regioselectiva de un grupo hidroxilo en el carbono C-4a y el control configuracional del grupo hidroxilo en el carbono C-5(*S**). La posterior transformación del grupo hidroxilo en el carbono C-4a a cetona, abre dos caminos para la incorporación del futuro carbono C-4 de la *rac*-TTX (*rac*-**1**).

Subruta A1: Implica una reacción nitroaldólica sobre la mencionada cetona, que conduce a la directa formación del análogo de la tetrodotoxina, el nitroalcohol **2**.

Subruta A2: Implica una reacción de Wittig sobre la mencionada cetona, para conducir directamente a la formación del análogo de la tetrodotoxina, el alqueniléster **3** o por la posterior secuencia de dihidroxilación y oxidación del correspondiente alcohol secundario al α -cetoéster **4**.

Los compuestos **2**, **3** y **4** poseen un esqueleto carbonado que coincide en diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos presentes en la TTX y contienen, con la disposición estereoquímica adecuada, la funcionalidad propia de ésta.

Ruta B: Incorporación del carbono C-4 y posterior introducción del carbono C-11 (ruta B, Esquema I).

La incorporación temprana del carbono C-4 se llevará a cabo a partir de la ciclohexenona **6**, mediante la adición ($A_{1,4}$) de cianuro para dar lugar a la ciano- β -lactama **9**.

El cianodimetilacetal **10**, que presenta las futuras posiciones C-6 y C-11 de la TTX convenientemente oxigenadas y protegidas como su dimetilacetal derivado, se preparará a partir de la ciano- β -lactama **9** mediante una secuencia que implica: i) reacción de Wittig y ii) dihidroxilación regio- y diastereoselectiva del dieno resultante y posterior formación del correspondiente acetal.

La apertura reductora de la función β -lactama del cianodimetilacetal **10** dará lugar al correspondiente aldehído, cuya posterior reducción conducirá al cianoaminoalcohol **5**, que posee un esqueleto carbonado que contiene diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10, C-11) de los once carbonos presentes en la TTX.

DISCUSIÓN DE RELSULTADOS

CAPÍTULO 1

EL MERCADO DE LA TETRODOTOXINA Y DE SUS ANÁLOGOS

1. EL MERCADO DE LA TETRODOTOXINA Y DE SUS ANÁLOGOS

Desde mediados del siglo XX, y cada vez más, los isótopos estables están acaparando la atención de numerosos mercados internacionales por las nuevas tecnologías que están emergiendo derivadas de su uso. La cada vez mayor variedad de aplicaciones relacionadas con los isótopos estables los ha convertido en pieza estratégica para el desarrollo y supremacía tecnológica de grandes potencias, como EEUU, en los que se ha desarrollado todo un programa nacional específico para su obtención y la explotación de nuevas tecnologías relacionadas con ellos, incluidas las relacionadas con información e inteligencia.¹

En este sentido, la disponibilidad de una cantidad suficiente tanto de moléculas de interés no accesibles fácilmente, así como de dichas moléculas en las que en su estructura sustituyan determinados átomos por isótopos estables, es decir, Referencias y Estándares Moleculares, es el primer requisito fundamental para poder aprovechar las ventajas que ofrece este tipo de tecnologías, así como para la investigación y el desarrollo de nuevas aplicaciones relacionadas con ellos.

Hasta la fecha, los mercados en los cuales han encontrado aplicación las tecnologías que implican la utilización de isótopos estables son numerosos y variados, pudiéndose agrupar todos ellos principalmente en dos grandes grupos, como son los mercados de orientación civil y los mercados de orientación a la seguridad y la defensa. Muchas de las tecnologías y aplicaciones derivadas de los isótopos estables son, por tanto, de doble uso.

¹ a) M.J. Rivard et al. "The US national isotope program: Current status and strategy for future success" *Applied Radiation and Isotopes* **2005**, 63, 157–178; b) http://www.isotopes.gov/outreach/reports/Program_Update_March2011.pdf; c) El National Isotope Development Center (NIDC) coordina la producción de isótopos en las instalaciones fundadas por el Department of Energy (DOE) y, para algunos isótopos críticos, también en instalaciones privadas. El NIDC es financiado por el Isotope Development and Production for Research and Applications (IDPRA) Program, junto con la Office of Nuclear Physics y la oficina de ciencia del DOE.

Dentro de los mercados de orientación civil, cabe destacar el mercado de la salud, donde los isótopos estables están jugando un papel cada vez más importante en el desarrollo de técnicas y tecnologías aplicadas a la industria farmacéutica y cosmética. Por su parte, en el ámbito de la industria orientada a la seguridad y la defensa, el empleo de isótopos estables en sistemas de codificación y trazabilidad se está convirtiendo en una herramienta poderosa y decisiva para la identificación de sustancias, así como en la lucha contra la falsificación y el fraude derivado del comercio y uso ilegal.

1.1. El mercado de la salud

La industria farmacéutica es la fuerza indiscutible del progreso de la terapéutica, y a ella debemos las principales conquistas de los últimos decenios para paliar el dolor y la enfermedad. Esto es debido a los tres aspectos fundamentales que definen este sector: altamente innovador, intensivo en I+D y altamente productivo.

El crecimiento de la industria farmacéutica se concentra en los países desarrollados con un nivel de industrialización alto. Los países con buena tecnología y avanzados en investigación disponen de los instrumentos y estructuras necesarias para poder sacar un adecuado rendimiento a los descubrimientos científicos. En el periodo 2001-2008, el crecimiento medio observado en el mercado farmacéutico a nivel mundial ha sido del 8%, situándose en el último año de la serie en el 4,8% (Tabla 1).

	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
Mercado Mundial (x10 ³ M US\$)	393	429	499	560	605	648	715	773
Crecimiento Interanual (%)	11,8	9,2	10,2	7,9	7,2	6,8	6,6	4,8

Tabla 1. Ventas del mercado farmacéutico a nivel mundial, periodo 2001-2008.²

El volumen de ventas del mercado farmacéutico global en 2008 está valorado en 773.000 millones US\$, y se divide fundamentalmente en 3 regiones, Estados Unidos, Europa y Japón, las cuales representan el 82,2% de las ventas totales en 2008 (Tabla 2).

Región	Ventas (x10 ³ M US\$)	%
América del Norte	311,8	40,3
Europa	247,5	32
Asia/Africa/Australia	90,8	11,8
Japón	76,6	9,9
América Latina	46,5	6
Total Mundial	773	100

Tabla 2. Mercado farmacéutico global en 2008.³

Europa se sitúa como la segunda región, dentro del mercado farmacéutico global, más importante a nivel mundial por volumen de ventas (247.500 millones US\$), situándose por detrás de EEUU (311.800 millones US\$) (Tabla 2). Durante el año 2008, y en el marco de una coyuntura económica adversa, se observa un crecimiento sostenido de los principales mercados farmacéuticos europeos, situándose en un promedio del 2,2%, que supone sólo 1,4 puntos menos que en el ejercicio precedente (Tabla 3).

² Fuente: IMS Health Market Prognosis; Marzo, 2009.

³ Fuente: IMS Health data: Pharmaceutical Executive, Mayo 2009.

Países	Valoración sobre el año anterior (%)		% Ventas sobre total 5 Países
	2007	2008*	2008
Alemania	4	4	30.8
Francia	5	0	26.8
Reino Unido	3	2	14.0
Italia	-3	1	15.0
España	8	4	13.4
Total 5 Países	3.6	2.2	100.0

Tabla 3. Evolución del mercado farmacéutico en los principales países Europeos.⁴

(* Datos 12 meses a Noviembre 2008 vs. Datos 12 meses a noviembre 2007)

En España, el sector industrial farmacéutico no tiene un peso muy elevado en el PIB nacional, pero sus peculiaridades (sector fuertemente innovador, intensivo en I+D y de alta productividad) se traducen en incrementos sostenidos del valor añadido, que aporta a la economía del país.

La industria farmacéutica en la Unión Europea es el motor del bienestar por el producto que fabrica y de riqueza por el valor económico y humano que genera y absorbe (Tabla 4). Representó unas ventas de 161.224 millones € en el año 2006, y generó 545.705 puestos de trabajo.

⁴ Fuente: Farmaindustria, a partir de IMS Retail Drug Monitor.

País	N.º lab ⁽¹⁾	Producción (millones €) ⁽²⁾	Empleo	Ventas int. (PVL) (millones €)	Comercio exterior (PVL) (millones €) ⁽³⁾	
					Import.	Export.
Alemania	310	23.699	113.200	24.353	27.591	35.785
Austria	124	1.874	9.593	2.544	3.914	4.252
Bélgica	142	5.261	29.155	3.684	28.102	30.448
Dinamarca	38	5.278	17.286	1.685	2.087	5.203
España	218	12.459	39.117	12.154	7.667	6.076
Finlandia	64	857	6.110	1.739	1.580	764
Francia	262	34.444	103.350	24.353	14.867	20.059
Grecia	64	666	11.450	4.244	2.939	909
Holanda	43	5.664	16.200	4.230	10.673	10.912
Irlanda	52	14.900	24.500	1.706	2.229	14.175
Italia	218	22.248	74.726	16.363	12.419	11.159
Portugal	137	1.829	10.581	3.321	1.836	347
Reino Unido	74	24.849	72.000	14.548	13.882	20.415
Suecia	62	7.196	18.434	2.802	2.539	6.933
Total UE-15	1.808	161.224	545.702	117.726	132.324	167.435

Nota: no se incluye Luxemburgo debido a su escasa representatividad

⁽¹⁾ Laboratorios miembros de las asociaciones EFPIA

⁽²⁾ Los datos se refieren a actividades de producción de medicamentos y materias primas de uso humano y veterinario, excepto en España, donde corresponde únicamente a la actividad destinada a uso humano.

⁽³⁾ Comercio exterior farmacéutico (SITC 54). Incluye productos veterinarios.

Tabla 4. Datos generales de la industria farmacéutica en Europa en 2006.⁵

El mercado farmacéutico es un mercado muy fragmentado, que se caracteriza por la presencia de submercados terapéuticos en los que concurren las distintas empresas que operan en el sector. Incluso las grandes firmas tienen como pilares básicos de su actuación preferente algunos submercados concretos. Esta circunstancia se traduce en unas cuotas de mercado que pueden ser altas en una dolencia concreta, pero su incidencia en la cuota global del mercado farmacéutico puede ser pequeña.

En la tabla 5 se muestra el ranking de las 15 clases terapéuticas principales de la industria farmacéutica, que representan el 93,7% de las ventas a nivel mundial del mercado farmacéutico en el año 2008.

⁵ Fuente: Farmaindustria a partir de EFPIA. Asociaciones de la industria farmacéutica de cada país y Eurostat.

	2008 rank (US\$)	2008 Sales (US\$ MN)	% Growth 2008 (LC\$)	2007 Sales (US\$ MN)	% Growth 2007 (LC\$)	2006 Sales (US\$ MN)	% Growth 2006 (LC\$)	2005 Sales (US\$ MN)	% Growth 2005 (LC\$)	2004 Sales (US\$ MN)	% Growth 2004 (LC\$)
Global Market	0	\$ 724,465	4.4	\$ 673,043	6.2	\$ 612,013	6.6	\$ 572,659	7.2	\$ 530,909	7.9
Oncologics	1	\$ 48,189	11.3	\$ 41,707	15.5	\$ 34,772	20.2	\$ 28,851	19.1	\$ 24,174	17.4
Lipid Regulators	2	\$ 33,849	-2.3	\$ 33,790	-7.1	\$ 35,322	7.4	\$ 32,788	6.5	\$ 30,653	12.6
Respiratory Agents	3	\$ 31,271	5.7	\$ 28,930	12.3	\$ 24,891	11.2	\$ 22,304	13.7	\$ 19,527	11.1
Antidiabetics	4	\$ 27,267	9.6	\$ 24,283	10.4	\$ 21,309	12.7	\$ 18,842	11.6	\$ 16,798	9.9
Acid Pump Inhibitors	5	\$ 26,525	0.6	\$ 25,751	3.3	\$ 24,220	4.3	\$ 23,204	5.3	\$ 21,972	3.9
Angiotensin II Antagonists	6	\$ 22,875	12.6	\$ 19,447	13.7	\$ 16,494	15.0	\$ 14,363	18.2	\$ 12,136	22.8
Antipsychotics	7	\$ 22,853	8.0	\$ 20,787	10.9	\$ 18,242	11.0	\$ 16,385	11.2	\$ 14,693	13.3
Antidepressants	8	\$ 20,336	0.6	\$ 19,781	-7.1	\$ 20,707	3.6	\$ 19,937	-3.8	\$ 20,646	2.1
Anti-epileptics	9	\$ 16,912	9.7	\$ 15,264	13.6	\$ 13,097	10.8	\$ 11,762	1.0	\$ 11,578	18.9
Autoimmune agents	10	\$ 15,933	16.9	\$ 13,320	21.0	\$ 10,687	20.7	\$ 8,837	31.2	\$ 6,736	43.6
Platelet Aggr. Inhibitors	11	\$ 13,633	10.3	\$ 11,969	8.3	\$ 10,678	7.8	\$ 9,892	9.9	\$ 8,970	18.6
HIV Antivirals	12	\$ 12,234	11.9	\$ 10,740	11.9	\$ 9,286	10.4	\$ 8,367	11.4	\$ 7,497	16.5
Erythropoietins	13	\$ 11,459	-13.9	\$ 12,969	-9.1	\$ 13,971	11.8	\$ 12,462	7.3	\$ 11,605	9.6
Non-narcotic analgesics	14	\$ 11,161	3.6	\$ 10,472	7.9	\$ 9,138	3.1	\$ 8,755	5.9	\$ 8,138	2.4
Narcotic analgesics	15	\$ 10,606	8.8	\$ 9,608	13.2	\$ 8,287	-2.2	\$ 8,435	2.9	\$ 8,188	13.9

Tabla 5. Las 15 clases terapéuticas más importantes a nivel mundial en 2008.⁵

Las biotoxinas, TTX y productos relacionados en especial, están especialmente indicada para los sectores de la ANALGESIA, la COSMÉTICA, las HEAVY DRUGS y las NUEVAS APLICACIONES TECNOLÓGICAS derivadas del empleo de ISÓTOPOS ESTABLES. El primero se encuentra dentro de las 15 clases terapéuticas más importantes a nivel mundial.

1.1.1. El mercado de la analgesia

El mercado mundial de los fármacos contra el dolor es un mercado en continuo crecimiento. Para hacerse una idea de esta afirmación, sólo en 2005 los medicamentos analgésicos facturaron a nivel mundial un total de 50.000 millones US\$ y era de esperar que a lo largo de 2010 alcanzase la cifra de 75.000 millones US\$. **Pfizer** es la compañía líder de este sector, con unas ventas de 5.500 millones US\$ en 2007. **Celebrex**[®] (Figura 1), su fármaco estrella contra el dolor, registró unas ventas de 3.100 millones US\$ en 2007.

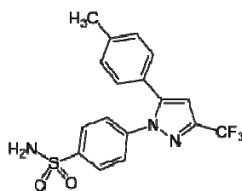


Figura 1. Estructura química de Celecoxib, principio activo del Celebrex[®].

Podemos clasificar los analgésicos en:

1.- No narcóticos: También denominados analgésicos menores. Estos a su vez se pueden clasificar:

1.1.- Según su mecanismo de actuación:

1.1.1.- Inhibidores periféricos de las prostaglandinas (AINES).

1.1.2.- Inhibidores centrales de las prostaglandinas.

1.1.3.- Inhibidores del receptor sensibilizado.

1.2.- Según su origen, composición o estructura química:

1.2.1.- Derivados acídicos.

1.2.2.- Derivados no acídicos.

1.2.3.- Miscelaneos.

2.- Narcóticos: También denominados analgésicos mayores. Estos a su vez se pueden clasificar:

2.1.- Según su origen y estructura química:

2.1.1.- Naturales.

2.1.2.- Semi-sintéticos.

2.1.3.- Sintéticos.

2.2.- Según su potencia analgésica:

2.2.1.- Débiles.

2.2.2.- De acción intermedia.

2.2.3.- Potentes.

2.3.- Según su actividad en el receptor:

2.3.1.- Agonistas.

2.3.2.- Agonistas parciales.

2.3.3.- Agonista-antagonista.

2.3.4.- Antagonista.

3.- Coadyuvantes-coanalgésicos: Son fármacos que sin ser analgésicos se emplean en terapias de dolor crítico. Estos a su vez se pueden clasificar en:

3.1.- Ansiolíticos.

3.2.- Antidepresivos.

3.3.- Anticonvulsivantes.

3.4.- Hipnóticos.

3.5.- Neurolepticos.

Los fármacos narcóticos y no narcóticos acumulan el 43% del mercado mundial de los fármacos contra el dolor, generando beneficios de 19.900 millones US\$ en 2007. El segmento de los narcóticos está dominado por **Mundipharma (OxyContin[®])**, mientras que el segmento de los no narcóticos, más fragmentado, está liderado por **BMS (Efferalgan[®])** y **Johnson&Johnson (Tylenol[®])** (Figura 2).



Figura 2. Estructura química de la Oxycodona (principio activo del OxyContin®) y del paracetamol (principio activo del Efferalgan® y Tylenol®).

El dolor es una de las causas más frecuentes de consulta médica, y su prevalencia, caracterizada por la prolongación del dolor de forma continua y persistente durante un mínimo de seis meses, se estima en un 23,4% de la población.⁶ En cuanto al número de pacientes, solamente en EEUU hay más de 75 millones de americanos que sufren dolor. En pacientes oncológicos, es el síntoma más temido y más frecuente, pues lo refieren al menos 2 de cada 3 pacientes con tumores avanzados.⁷

El empleo de fármacos narcóticos y analgésicos (N2A),⁸ fundamentalmente AntiInflamatorios No Esteroideos (AINE's) y opioides, en el tratamiento del dolor oncológico se posiciona como una de las 15 clases terapéuticas con mayor cuota en el mercado farmacéutico a nivel mundial, con un volumen de ventas en el año 2008 de 10.606 millones US\$ y un crecimiento interanual del 8,8%.⁹

El protocolo empleado para el tratamiento y control del dolor oncológico es la escalera analgésica de la Organización Mundial de la Salud (OMS)

⁶ Mateos, G.; Camps H., C.; Lara Suriñach, N.; Polanco Sánchez, C. *Rev. Esp. Econ. Salud* **2008**, 7, 157-164.

⁷ Arranz Arijá, J. A. "Titulación de los opioides, y escalas de conversión de los opioides"; Sº de Oncología Médica; Hospital Gregorio Marañón.

⁸ N2A: Clase terapéutica: Narcóticos y Analgésicos.

⁹ Fuente: IMS Health: "Top 15 Global Therapeutic Classes"

(Figura 3),¹⁰ que se considera eficaz en un 90% de los enfermos de cáncer y en más del 75% de los pacientes en fases terminales. Este protocolo de actuación se compone de tres niveles o escalones. En el primer nivel, se incluyen analgésicos antiinflamatorios (AINE's) y antitérmicos, asociados o no a coadyuvantes (fármacos antiepilépticos, antidepresivos, hipnóticos o corticoides), para el dolor leve. Si progresa el dolor, se pasa al segundo nivel, en el que se incluyen opioides menores o débiles (tramadol, codeína, etc.) asociados o no a los AINE's y a los coadyuvantes, si es preciso. Cuando el dolor se vuelve intenso y no responde a los fármacos anteriores, se pasa al tercer nivel, en el que se administran los opioides mayores (morfina, fentanilo, etc.).

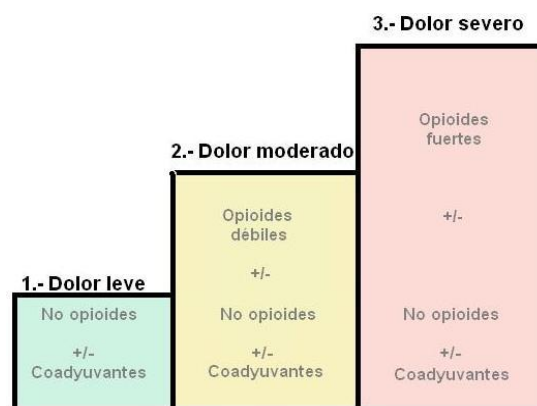


Figura 3. Escalera analgésica de la OMS.

Los fármacos AntiInflamatorios No Esteroideos (AINE's) son uno de los tipos de fármacos de mayor consumo a nivel mundial, estimado en torno a 216 millones de dosis al día, con una media de consumo de 100 comprimidos de aspirina por persona y año. Sólo en EE.UU. aproximadamente 33 millones de

¹⁰ OMS *Alivio del dolor en el cáncer, segunda edición* (<http://whqlibdoc.who.int/publications/9243544829.pdf>).

pacientes los consumen de manera regular, y generan un volumen de ventas anuales que sobrepasa los 12.000 millones US\$.

Existen más de 70 moléculas aprobadas y comercializadas como AINE's, de las que solamente se emplean de manera mayoritaria 4 o 5 (**ácido acetil salicílico, paracetamol, ibuprofeno, diclofenaco y naproxeno**). Varían desde los fármacos que se venden sin receta hasta los de prescripción médica, con más de 70 millones de prescripciones y más de 30 billones de tabletas vendidas sin receta.

La **Aspirina®** (ácido acetil salicílico, **Bayer**) es el fármaco de este tipo más usado en la actualidad por volumen, número de pacientes y producción. El volumen de ventas de Aspirina® asciende a 1.100 millones US\$ durante los dos últimos años. **Tylenol®** (**Johnson&Johnson**) y **Panadol®** (**GlaxoSmithKline**), con unas ventas de 1.100 millones US\$ en 2008, son marcas que emplean paracetamol como principio activo. Las marcas líderes que contienen ibuprofeno, con unas ventas de 1.100 millones US\$, son **Advil®** (**Wyeth**), **Motrin®** (**Pfizer**) y **Brufen®** (**Abbott**). **Voltaren®** (**Novartis**) utiliza diclofenaco, con unas ventas de 1.100 millones US\$ en 2008. Por su parte, **Naprosyn®** (**Roche**) emplea naproxeno, con unas ventas de 600 millones US\$ en 2008.

Los AINE's se caracterizan por su acción terapéutica como antiinflamatorios, analgésicos y antitérmicos.

Los antiinflamatorios naturales, biosintetizados por el propio organismo, son sustancias derivadas de los corticoides, que poseen una estructura química de origen esteroideo y una potente acción antiinflamatoria, pero que presentan importantes efectos secundarios (gastritis, defectos en los depósitos de calcio en los huesos, acumulación de grasa corporal, etc.). En oposición a los corticoides, el término "no esteroideo" se aplica a los AINE's para recalcar su diferente estructura química (no esteroidea) y la menor cantidad de efectos secundarios que

presenta su utilización. Empleados como analgésicos, los AINE's se caracterizan principalmente por a) no pertenecer a la clase de los narcóticos y b) actuar bloqueando la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.

A pesar de su éxito comercial, el empleo continuado de AINE's causa efectos secundarios conocidos, fundamentalmente de tipo gastrointestinales que incluyen úlceras y hemorragias, y conllevan una alta morbilidad y mortalidad. Un elevado número de pacientes que toman AINE's de forma continuada (aproximadamente 18 millones de americanos que presentan osteoartritis), están en riesgo de presentar problemas gastrointestinales. Las muertes anuales por este tipo de problemas ascienden a 16.500 en EEUU, de manera similar en escala a las muertes provocadas por otras enfermedades, como el SIDA.

La analgesia opioide continúa siendo la piedra fundamental del manejo del dolor.¹¹ El valor estimado del mercado mundial de los opioides es de 10.000 millones US\$ en 2008, y se espera un crecimiento sostenido del 4% hasta alcanzar un valor de 11.900 millones US\$ en 2018. Éste es un mercado maduro, y la estrategia que se ha empleado para el mantenimiento de su valor durante las últimas décadas, en presencia de fármacos genéricos, se debe al desarrollo de nuevas formulaciones (liberación controlada, parches, combinaciones con dosis fijas, etc), lo que hace posible su exclusividad en el mercado y la posibilidad de un aumento en el precio.

¹¹ Los opioides están catalogados como Medicamentos esenciales (ME) según la última lista publicada por la OMS en el año 2011. Desde 1977, la OMS publica una lista de los medicamentos esenciales, que son aquellos que satisfacen las necesidades prioritarias de salud en la población. La selección viene dada por: pertinencia para la salud pública, prueba de su eficacia y seguridad, y su eficacia comparativa en relación a su costo. La OMS recomienda que los ME estén disponibles en los sistemas de salud en todo momento, en cantidades suficientes, en la presentación farmacéutica adecuada, con las garantías de calidad e información y a un precio que los pacientes y la comunidad puedan pagar.

Ver: <http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/en/>

La **morfina** (Figura 4) sigue siendo la droga de elección para el tratamiento del dolor severo por su disponibilidad, coste y propiedades farmacológicas. Sin embargo, cuando se utiliza morfina, existe un grupo de pacientes –que varía de 10% a 30%– en quienes se observa una pobre respuesta analgésica, por aparición de elementos de toxicidad.

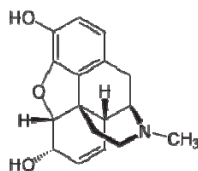


Figura 4. Estructura química de la Morfina.

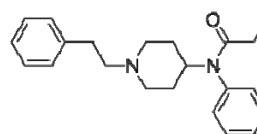
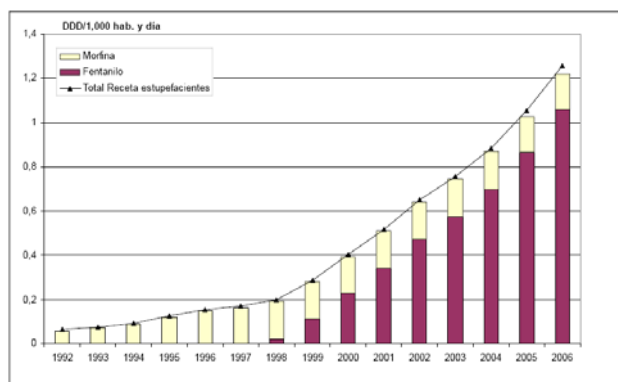
Los efectos adversos de la morfina son frecuentes. Afectan principalmente al sistema nervioso central y a los aparatos digestivo y respiratorio. Los efectos adversos son náuseas, vómitos, estreñimiento, somnolencia, desorientación, sudoración, euforia, cefalea, agitación, temblor, convulsiones, alteraciones del humor (ansiedad, depresión), rigidez muscular, alucinaciones, insomnio, hipertensión intracraneal, sequedad de boca, depresión respiratoria, apnea, parada cardíaca, retención urinaria, reducción de la libido, impotencia, visión borrosa, nistagmo, diplopía, miosis, edema, prurito, urticaria, dermatitis de contacto.

En España, y en parte de Europa, se está produciendo una creciente concentración en unos pocos principios activos (API's) para la preparación de fármacos prescritos para el tratamiento del dolor oncológico. Los opioides empleados en analgesia se concentran en unas pocas moléculas, principalmente **morfina, oxicodona, fentanilo, oximorfona y tramadol**.

OxyContin[®] (oxicodona, **Mundipharma**), **Duragesic[®]** (fentanilo, **Janssen Pharmaceutica**), **Kadian[®]** (morfina, **Alpharma**), **Avinza[®]** (morfina,

King Pharmaceuticals) y **Opana®** (oximorfona, **Endo Pharmaceuticals**) son ejemplos de fármacos basados en reformulaciones de liberación controlada de opioides. Este submercado se valoró en 3 billones de US\$ en 2007.

En España, el **Tramadol** y el **Fentanilo** representan el 86% del total de los opioides empleados en analgesia. De hecho, el Fentanilo está sustituyendo de manera progresiva a la morfina (Figura 5), fármaco de elección para el dolor oncológico intenso según la OMS.¹²



Fentanilo

Figura 5. Evolución del uso de opioides que requieren receta de estupefacientes en España (datos del sistema nacional de salud) y estructura química del fentanilo.

Este drástico aumento en el consumo se refleja en el volumen de ventas a nivel mundial durante el año 2008 de **Duragesic®** (**Janssen Pharmaceutica**), fármaco de referencia que contiene fentanilo como principio activo, que ascendió a 1.100 millones US\$. Paralelamente, el volumen de ventas de fármacos genéricos basados en fentanilo durante el año 2008 asciende a 900 millones US\$, siendo uno de ellos, propiedad de **Mylan Pharmaceuticals**, el fármaco genérico con mayor volumen de ventas a nivel mundial durante 2008 (500 millones US\$).¹³ Debido a la

¹² Fuente: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS).

¹³ Fuente: IMS Health; *Top generics of 2008*.

existencia de numerosos fármacos genéricos basados en fentanilo, se estima que **OxyContin® (Mundipharma)** se convertirá en el fármaco de referencia con mayor cuota de mercado, con unas ventas estimadas de 3.000 millones US\$.

De manera paralela, se están desarrollando fármacos innovadores no basados en opiáceos para el manejo del dolor en el cáncer, denominados *Sodium Channels Blockers*, y que presentan dos características fundamentales:

- a) Poseen una potencia analgésica al menos como la de la morfina.
- b) No presentan los efectos secundarios de la morfina.

El máximo exponente de este nuevo tipo de fármacos es Tectin® (Wex Pharmaceuticals Inc.),¹⁴ que se encuentra en fase clínica III, y que utiliza la Tetrodotoxina (TTX) como API. Este compuesto posee una potencia analgésica 2.000 veces mayor que la morfina, y no presenta ninguno de los efectos secundarios de aquella. Hasta la fecha, la TTX se ha obtenido fundamentalmente de una única fuente, el pez globo. El empleo de la TTX como API está condicionado por la escasez y dificultad para la obtención de la TTX de la fuente natural (el pez globo), así como por el elevado coste, tanto biológico como financiero, que supone su extracción. Al igual que la TTX, la Saxitoxina (STX) posee una potencia analgésica 3.000 veces mayor que la morfina, y no presenta ninguno de los efectos secundarios de aquella, lo que la convierte en candidato para el desarrollo de nuevos fármacos contra el dolor.¹⁵

¹⁴ Fuente: Wex Pharmaceuticals; www.wexpharma.com

¹⁵ Hasta la fecha, la STX está listada como arma química de tipo 1 (Chemical Weapon Schedule 1 List) por la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (Organisation for the Prohibition of the Chemical Weapons, OPCW). Al igual que en el caso de la TTX, se espera su aprobación para su uso terapéutico.

1.1.2. El mercado de la cosmética¹⁶

Allergan domina el mercado de neuromoduladores gracias a **Botox**[®], toxina botulínica¹⁷ de tipo A. Botox[®] facturó en 2008 1.310 millones de dólares y era de esperar que en el año 2010 sus ventas hayan oscilado entre 1.330-1.370 millones de dólares. A través de Botox[®], Allergan tiene una cuota aproximada del 83% del mercado mundial de neurotoxinas empleadas como relajantes musculares y nerviosos.

Este mercado ha crecido significativamente en la última década, como muestra el dato de que en 2008 se practicaron en EEUU más de cinco millones de intervenciones estéticas empleando la toxina botulínica. Sin embargo, la crisis ha ralentizado su crecimiento, como muestra la evolución de la facturación de Allergan gracias al Botox[®], que creció un 29% en 2007 con respecto al año anterior mientras que en el periodo 2008-2010 se esperaba un crecimiento moderado de entre el 1,5% y el 4,6%. En España, Botox[®] es también líder frente a sus competidores, con una facturación en 2007 de 9,07 millones de euros (datos de IMS Health).

El dominio absoluto de Allergan, sin embargo, puede verse afectado por la aprobación por parte de la FDA en 2009 de otra toxina botulínica de tipo A para uso cosmético. Esta toxina ha sido desarrollada por el laboratorio farmacéutico francés **Ipsen**. Ipsen ha desarrollado una toxina con dos campos de aplicación: terapéutico (indicado para distonía cervical) y estético. Ipsen comercializa el fármaco para uso terapéutico, con el nombre comercial de

¹⁶ Fuentes de información: Memorias de Actividades Allergan e Ipsen, Asociación Americana de Cirujanos Plásticos, Cinco Días, IMS Health

¹⁷ La toxina botulínica está listada como arma química de tipo 1 (Chemical Weapon Schedule 1 List) por la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (Organisation for the Prohibition of the Chemical Weapons, OPCW). Al igual que en el caso de la TTX, está aprobado su uso terapéutico.

Dysport®, que facturó en el año 2008 142,5 millones de euros en todo el mundo, un 10,5% más que el año anterior.

En cuanto a su uso como cosmético, su estrategia ha consistido en licenciar a terceros su comercialización. Así en EEUU, Canadá y Japón la comercializadora es, a cambio de un pago de 100 millones de dólares, más royalties por ventas, **Medicis Pharmaceutical Corp**, con el nombre comercial de **Reloxin®**, y en Europa a través de **Galderma**, bajo el nombre **Azzalure®**. Ambas empresas consiguieron autorización para comerciar el producto a lo largo de 2009.

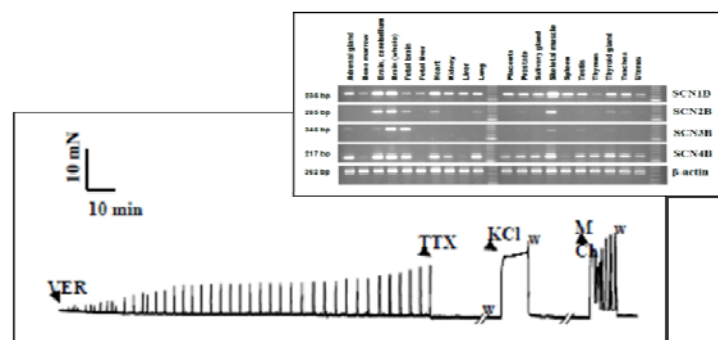


Figura 6. Modelo biológico y escalado para el estudio de la actividad de la TTX (sus análogos, derivados y compuestos relacionados) sobre los canales de sodio.

El empleo de la TTX como cosmético está recogido en una patente propiedad de Allergan, en la que se indica la posible aplicación de esta neurotoxina en el campo de la cosmética, y su posible uso en sustitución de la toxina botulínica.¹⁸

Es importante resaltar que los canales de sodio dependientes del voltaje son responsables de la generación de potenciales eléctricos en neuronas y otros

¹⁸ (a) Tezel, A.; Blanca, W. M.; Hughes, P. M.; Whitcup, S. M.; Chang, J. N.; Robinson, M.R. Dermal Filler. Related Application. Patent US 20090155314, Jun 18, 2009. (b) Recientemente, la FDA ha probado el uso del Botox® para el tratamiento de migrañas severas.

tipos de células, donde juegan un papel central en los mecanismos de acoplamiento estímulo-respuesta celular. La importancia de estos canales iónicos queda reflejada en diferentes estudios, que demuestran la correlación existente entre diversas enfermedades neurodegenerativas, metabólicas o cardíacas de carácter hereditario y la existencia de mutaciones en alguna o algunas de las subunidades constituyentes del canal o proteínas relacionadas. Los estudios biomédicos realizados han demostrado que determinadas familias de poliómeros fusionados, representadas por las sustancias naturales brevetoxina-B, brevetoxina-A y ciguatoxina-1 (Figura 6), se comportan como agonistas selectivos a nivel de canales de sodio dependientes de voltaje, induciendo una despolarización permanente de la membrana y la generación de potenciales de acción espontáneos.

Estos efectos son debidos a la apertura del canal y a la inhibición del cierre del mismo tras periodos prolongados de despolarización. Otras toxinas, como la **tetrodotoxina (TTX)** y la **saxitoxina (STX)**, se comportan como potentes y selectivos inhibidores de los canales de sodio y ello es debido, al menos en parte, a la interacción con un residuo aromático específico localizado en el lazo P del primer motivo transmembrana.

Paralelamente, los canales presentes en el cerebro y músculo esquelético muestran una elevada sensibilidad a la TTX mientras que otros canales, como los presentes en el músculo cardíaco, se clasifican como "resistentes" a la TTX.¹⁹ Ello sugiere que las diferencias existentes a nivel molecular entre los distintos tipos de canales de sodio condicionan, al menos en parte, la fijación específica de estas

¹⁹ Seda, M., Pinto, F. M.; Wray, S.; Cintado, C. G.; Noheda, P.; Buschmann, H.; Candenas, M. L. Functional molecular characterization of voltage-gated sodium channels in uteri from nonpregnant rats *Biol. Reprod.* **2007**, 77, 855-863

toxinas.²⁰ Hasta el momento, el conocimiento adquirido en relación a los canales de Na es muy inferior al adquirido sobre los canales de Ca o K debido, en gran medida, a la ausencia de modelos sencillos que permitan estudiar a gran escala los efectos de compuestos con posible actividad selectiva sobre estos canales. Ante la falta de esos modelos, las técnicas que permiten, de manera general, el estudio de los canales de Na son las técnicas de electrofisiología, las de clonación en un determinado tipo celular, o las de silenciamiento de la expresión de un determinado tipo de canal (obtención de ratones knock-outs). Ello puede explicar el desconocimiento actual de fármacos con selectividad sobre un determinado tipo de canal de Na.

1.1.3. Heavy Drugs²¹

Recientemente, algunas compañías biotecnológicas han patentado y están llevando a cabo grandes progresos en diferentes ensayos clínicos con versiones deuteradas²² de fármacos comerciales. Los análogos deuterados, también denominados, de manera general *heavy drugs*, en los que determinados enlaces carbono-hidrógeno son reemplazados por enlaces carbono-deuterio, están demostrando tener un ciclo metabólico mayor, mayores índices de seguridad, y mayor efectividad que el fármaco original. Se están llevando a cabo estudios preclínicos y clínicos en diferentes áreas terapéuticas, como enfermedades infecciosas, desórdenes depresivos, hipertensión arterial, cáncer, artritis, y SIDA.

Durante décadas, los bioquímicos han empleado el “efecto cinético isotópico” del deuterio en estudios metabólicos para determinar reacciones

²⁰ Candenas, L.; Seda, M.; Noheda, P.; Buschmann, H; Cintado, C. G.; Martín, J. D.; Pinto, F. M. Molecular diversity of voltage-gated sodium channel and subunit mRNAs in human tissues *Eur. J. Pharmacol* **2006**, *541*, 9-16.

²¹ Drug Discovery & Development *Magazine* **2009**, *12*, 6-8.

²² El deuterio es un isótopo no radiactivo del hidrógeno, que contiene un protón y un neutrón, en lugar de solo un protón.

enzimáticas. Pero sólo de manera reciente se está estudiando su diferente efectividad. Dependiendo de la clase de fármaco, esta nueva aproximación puede permitir una amplia variedad de efectos beneficiosos, como son una mayor duración de la acción, un mejor perfil de seguridad, así como la reducción de metabolitos tóxicos.

Auspex Pharmaceuticals Inc. (Vista, Calif.)²³ ha presentado más de 150 patentes de fármacos deuterados. Una de ellas es la de **SD-254**, un análogo del blockbuster **venlafaxina**,²⁴ originalmente comercializado por **Wyeth** como **Effexor®** en 1993 para el tratamiento de los procesos depresivos. En 2008, Auspex anunció los resultados de la fase clínica I, demostrando que el fármaco se metabolizaba la mitad de rápido que la venlafaxina, manteniendo los niveles de acción en el cuerpo durante más tiempo.

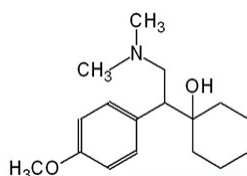


Figura 7. Estructura química de la venlafaxina.

Por su parte, **Concert Pharmaceuticals Inc.** (Lexington, Mass.),²⁵ presentó en 2008 los resultados pre-clínicos de **Linezolid C-20081** (Figura 7), un antibiótico deuterado tipo oxazolidinona, para una posible dosificación oral o intravenosa unitaria diaria. En este estudio, el Linezolid C-20081 presenta un incremento de la vida media en plasma del 43% comparado con la **linezolid**, que permitiría dosis inferiores de fármaco y una mejor tolerabilidad para infecciones como las provocadas por el estafilococo aurea resistente a meticilina (MRSA) y la tuberculosis resistente.

²³ www.auspexpharma.com/

²⁴ Selective Serotonin-Norepinephrine Reuptake Inhibitor (SNRI)

²⁵ www.concertpharma.com/

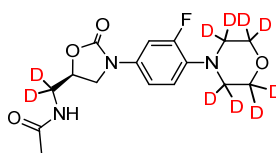


Figura 7. Estructura química del Linezolid C-20081.

Concert también está llevando a cabo un estudio de fase clínica I para **CTP-347**, una versión deuterada del antidepresivo paroxetina, un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI), fármaco blockbuster vendido como **Seroxat®** y **Paxil®** por **GlaxoSmithKline** a partir de 1992. La versión deuterada del fármaco mostró una inhibición metabólica menor que su homólogo no deuterado. Al igual que Auspex, Concert ha presentado más de 100 patentes de un amplio número de fármacos deuterados.

Fundada en 2006, Concert ha conseguido más de 110 millones US\$ de capital tanto privado como institucional. Ha firmado un acuerdo de colaboración con GlaxoSmithKline (GSK), que potencialmente puede aportarle 1 billón US\$. La compañía ya ha recibido un pago por adelantado de 35 millones US\$, de los cuales 16 millones US\$ vienen en forma de capital riesgo. Como parte de la alianza, Concert podrá recibir pagos por hitos y royalties de sus productos deuterados, así como de los productos deuterados que GSK pueda desarrollar. Como parte del programa de GSK denominado HIV-PI, el producto de Concert CTP-298 fue seleccionado como *lead* para su posterior desarrollo, con planes de iniciar fases clínicas en 2012.

Como consecuencia de que los fármacos deuterados tienen aproximadamente las mismas propiedades que sus homólogos no deuterados, estas compañías esperan que la FDA sea menos exigente con los estudios toxicológicos y

ensayos clínicos, permitiendo a estas empresas llevar sus productos al mercado en menos tiempo y con menor coste.

Empleando esta estrategia, **Protia LLC**,²⁶ una pequeña empresa biotecnológica (Nevada), ha presentado cientos de patentes de versiones deuteradas de fármacos populares, que van desde el **fingolimod** (Figura 8)²⁷ enriquecido en deuterio (para esclerosis múltiple) hasta la **atorvastatina** (que regula los niveles de colesterol).

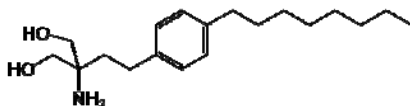


Figura 8. Estructura química del Fingolimod.

En el campo de las biotoxinas, TTX y sus análogos, es de esperar la ampliación de estas tecnologías a otros isótopos estables tales como ^{15}N y ^{13}C .

1.1.4. Nuevas tecnologías

1.1.4.1. Espectrometría de masas

En los isótopos estables, las diferencias de masa son lo suficientemente grandes como para que las características físicas y químicas de las moléculas que los contienen, sean ligeramente diferentes. El ejemplo más clásico es el de la presión de vapor de una molécula de agua que contiene los isótopos pesados de oxígeno e hidrógeno (^{18}O y ^2H), que es ligeramente inferior a la de aquella que contiene los ligeros (^{16}O y ^1H). Al evaporarse, las moléculas que pasarán primero a vapor serán aquellas más “ligeras” ($^1\text{H}^1\text{H}^{16}\text{O}$). En la naturaleza tienen lugar

²⁶ www.protia.com/

²⁷ La aprobación de la FDA convierte a Fingolimod en el primer tratamiento oral para las formas recurrentes de la EM en los Estados Unidos, que es comercializado en España por la compañía Novartis.

muchos procesos fisicoquímicos (incluyendo las reacciones enzimáticas) que determinan la forma en que los isótopos se reparten entre diferentes sustancias o entre diferentes fases de una misma sustancia, y a esto se le conoce como *fraccionamiento isotópico*. Como resultado de estos procesos de fraccionamiento nos encontramos con sustancias que difieren ligeramente en la distribución de los isótopos estables y por tanto en su masa, diferencias que pueden medirse mediante la *Espectrometría de Masas de Razones Isotópicas* (IRMS o GIRMS, en sus siglas inglesas) en lo que denominamos estudios de *abundancia natural*.

No obstante, está alcanzando una enorme popularidad el uso de los isótopos estables como trazadores añadidos al medio que se estudia. En este caso las diferencias serían mucho mayores y hablaríamos de análisis de *muestras enriquecidas o muestras marcadas*.

Inicialmente, el estudio de los isótopos estables estuvo relacionado mayoritariamente con la geoquímica y los estudios de abundancia natural, pero con el desarrollo de los espectrómetros de masas de flujo continuo y la posibilidad de usar las sustancias marcadas, su aplicación se extendió a las ciencias biológicas, de tal modo que hoy en día es una técnica analítica casi rutinaria en muchos campos de investigación.

La determinación de la composición isotópica de C, N, O o H de compuestos moleculares o biomoléculas (biomarcadores también pueden denominarse) mediante la técnica GCC-IRMS (también se puede encontrar como GC-IRMS, GC-C/TC-IRMS o irmGC/MS) es una aplicación relativamente reciente que ha revolucionado el campo de la isotopía. Poder medir a nivel de picomoles de compuesto, en mezclas previamente separadas por medio de la cromatografía de gases, permite la aplicación de los análisis de isótopos estables en situaciones donde hasta hace poco tiempo era imposible por la enorme cantidad de tiempo y esfuerzo necesario para aislar las sustancias de interés.

Así podemos encontrar análisis isotópicos en estudios metabólicos, en biodegradación, en ecología microbiana, en arqueología o en estudios paleoambientales por poner sólo algunos ejemplos. Siendo los compuestos estudiados del tipo ácidos grasos, aminoácidos, alcanos, alcoholes, PAHs, PCBs, entre otros.²⁸ Se está realizando su extensión a biomoléculas en la actualidad.

1.1.4.2. PET (*Positron Emission Tomography*)

La **tomografía por emisión de positrones** o **PET** (por las siglas en inglés de *Positron Emission Tomography*), es una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación “in vivo” por imagen capaz de medir la actividad metabólica del cuerpo humano. Al igual que el resto de técnicas diagnósticas en Medicina Nuclear, la PET se basa en detectar y analizar la distribución tridimensional que adopta en el interior del cuerpo un radiofármaco de vida media ultracorta administrado a través de una inyección intravenosa. Según qué se desee estudiar se usan diferentes radiofármacos.

La imagen se obtiene gracias a que los tomógrafos son capaces de detectar los fotones gamma emitidos por el paciente. Éstos fotones gamma de 511 Kev son el producto de una aniquilación entre un positrón, emitido por el radiofármaco, y un electrón cortical del cuerpo del paciente. Ésta aniquilación da lugar a la emisión, fundamentalmente, de dos fotones. Para que estos fotones acaben por conformar la imagen deben detectarse “en coincidencia”, es decir, al mismo tiempo; en una ventana de tiempo adecuada (nanosegundos), además deben provenir de la misma dirección y sentidos opuestos, pero además su energía debe superar un umbral mínimo que certifique que no ha sufrido dispersiones

²⁸ Torsten C. Schmidt, Luc Zwank, Martin Elsner, Michael Berg, Rainer U. Meckenstock, Stefan B. Haderlein “Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges” *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 283-300.

energéticas de importancia en su trayecto (fenómeno de scatter) hasta los detectores. Los detectores de un tomógrafo PET están dispuestos en anillo alrededor del paciente, y gracias a que detectan en coincidencia a los fotones generados en cada aniquilación, conformaran la imagen. Para la obtención de la imagen, estos fotones detectados son convertidos en señales eléctricas. Esta información posteriormente se somete a procesos de filtrado y reconstrucción, gracias a los cuales se obtiene la imagen.

Existen varios radiofármacos emisores de positrones de utilidad médica. El más importante de ellos es el Flúor-18, que es capaz de unirse a la 2-O-trifluorometilsulfonil manosa para obtener el trazador 18-Flúor-Desoxi-Glucosa (18FDG). Gracias a lo cual, tendremos la posibilidad de poder identificar, localizar y cuantificar, a través del SUV (Standardized Uptake Value), el consumo de glucosa. Esto resulta un arma de capital importancia para el diagnostico médico, puesto que muestra qué áreas del cuerpo tienen un metabolismo glucídico elevado, que es una característica primordial de los tejidos neoplásicos. La utilización de la 18FDG por los procesos oncológicos se basa en que en el interior de las células tumorales se produce, sobre todo, un metabolismo fundamentalmente anaerobio que incrementa la expresión de las moléculas transportadoras de glucosa (de la GLUT-1 a la GLUT-9), el aumento de la isoenzima de la hexokinasa y la disminución de la glucosa-6-fosfatasa. La 18FDG sí es captada por las células pero al no poder ser metabolizada, sufre un "atrapamiento metabólico" gracias al cual se obtienen las imágenes.

Así, la PET nos permite estimar los focos de crecimiento celular anormal en todo el organismo, en un solo estudio, por ser de un estudio de cuerpo entero, por lo tanto nos permitirá conocer la extensión. Pero además sirve, entre otras cosas, para evaluar en estudios de control la respuesta al tratamiento, al comparar el comportamiento del metabolismo en las zonas de interés entre los dos estudios.

Para el paciente la exploración no es molesta ni dolorosa. Se debe consultar en caso de mujeres lactantes o embarazadas ya que en estas situaciones se debe de retrasar la prueba, o bien no realizarse. Se debe acudir en ayunas de 4-6 horas, evitando el ejercicio físico en el día previo a la exploración y sin retirar la medicación habitual. La hiperglucemia puede imposibilitar la obtención de imágenes adecuadas, obligando a repetir el estudio posteriormente. Tras la inyección del radiofármaco, el paciente permanecerá en una habitación en reposo. La exploración tiene una duración aproximada de 30-45 minutos.

Además de la oncología, donde la PET se ha implantado con mucha fuerza como técnica diagnóstica, desplazando al TAC como primera opción diagnóstica en algunas indicaciones, otras áreas se benefician de este tipo de exploraciones, como son la neurología y la cardiología. También tiene un gran papel en estudios de experimentación clínica. En la actualidad, se está llevando a cabo una intensa labor investigadora con los isótopos ^{14}N y ^{15}N .

1.2. El mercado de la seguridad y la defensa

La falsificación, la piratería y el comercio ilícito de productos constituyen tres de los problemas más acuciantes de seguridad a nivel mundial de la sociedad del siglo XXI. Se estima que desde 1982, el comercio mundial de mercancías ilegales aumentó desde 55.000 millones US\$ a unos 600.000 millones US\$ en forma anual, en parte impulsado también por la demanda, según indica un informe de la Coalición Internacional Anti-falsificación (IACC, por sus siglas en inglés).²⁹ Esta actividad ilícita contribuye no sólo al desempleo y al déficit presupuestario

²⁹ La Conferencia Internacional Anticorrupción (IACC) es el principal foro mundial que convoca a jefes de estado y de gobierno, la sociedad civil, el sector privado y otras partes para abordar los desafíos cada vez más sofisticados que plantea la corrupción. Se celebra cada dos años en una región del mundo distinta y atrae hasta 1.500 participantes de más de 135 países. La IACC constituye el principal foro mundial para la creación de redes y el enriquecimiento mutuo indispensables en la incidencia y las acciones eficaces de los ámbitos nacional e internacional.

de los países que la sufren, sino especialmente comprometen el futuro de la economía mundial.

La falsificación es ilegal y la adquisición de productos falsificados apoya actividades al margen de la ley, como el narcotráfico y el comercio de armas. Para el consumidor existe una velada amenaza a su salud y seguridad, atendiendo al auge de la falsificación de productos tan diversos como los medicamentos o piezas de avión.

RANKING DE RUBROS FALSIFICADOS Y SU VALOR FINANCIERO EN EL MERCADO NEGRO		
Falsificación de medicamentos	US\$ 200 mil millones	Ingresos por falsificaciones en el comercio mundial: US\$ 585,38 mil millones
Electrónicos pirateados	US\$ 100 mil millones	
Software pirata	US\$ 58,8 mil millones	
Alimentos falsificados	US\$ 49 mil millones	
Piezas falsificadas de automóviles	US\$ 45 mil millones	
Juquetes falsificados	US\$ 34 mil millones	Valor medio de mercado de la falsificación: US\$ 20,90 mil millones
Películas piratas	US\$ 25 mil millones	
Músicas piratas	US\$ 12,5 mil millones	
Calzados falsificados	US\$ 12 mil millones	
Cable pirateado	US\$ 8,5 mil millones	
Videojuegos pirateados	US\$ 8,1 mil millones	Fuentes: www.havocscope.com www.iacc.org www.justice.gov
Ropa deportiva	US\$ 6,5 mil millones	
Tabaco falsificado	US\$ 4 mil millones	

Tabla 6. Principales tipos de productos falsificados en 2010.³⁰

Numerosas instituciones internacionales están involucradas en la lucha contra la falsificación y la piratería, entre las que se encuentran la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), la Organización Internacional de Policía Criminal (INTERPOL), la Organización Mundial de Aduanas (OMA), la Cámara de Comercio Internacional [ICC, mediante su iniciativa BASCAP (Business Action to Stop Counterfeiting and Piracy)], y la Asociación Internacional de Marcas (INTA).

³⁰ Fuente: <http://www.abc.com.py/nota/pirateria-y-falsificacion-financian-e-impulsan-al-crimen-organizado/>

Empleando la clasificación adoptada por INTERPOL,³¹ *las Referencia y Estándares Moleculares* de biotoxinas y productos relacionados con estructuras moleculares altamente complejas para el desarrollo e implementación de nuevas soluciones tecnológicas están dirigidas a la lucha contra la falsificación, la piratería y el comercio ilícito, fundamentalmente en los campos de:

- a) Productos farmacéuticos y cosméticos
- b) Armas de destrucción Masiva (ADM)
- c) Seguridad alimentaria

1.2.1. La falsificación de medicamentos: Una amenaza creciente³²

En 2009, una operación de cinco meses de duración coordinada por la INTERPOL en China y siete de sus países vecinos en Asia sudoriental, se incautaron 20 millones de píldoras, frascos y sobres de medicamentos falsificados e ilícitos, se detuvo a 33 personas y se cerraron 100 puntos de venta al por menor.

En una serie de redadas que se llevaron a cabo también durante el año 2009 se localizaron medicamentos falsificados por valor de cientos de millones de dólares y se descubrió una red delictiva que vendía esas mercancías a consumidores de todo Oriente Medio. En Europa, en sólo dos meses, funcionarios de aduanas incautaron 34 millones de píldoras falsificadas.

Los resultados de esta cadena de operaciones emprendidas en todo el mundo para hacer cumplir la ley han ido revelando el perfil de un comercio que sorprende incluso a los funcionarios de los organismos de reglamentación familiarizados con este problema. Los expertos sanitarios consideran que esas operaciones no han hecho más que destapar una mínima parte de una industria

³¹ Fuente: <http://www.interpol.int/es/Centro-de-prensa/Publicaciones>. (Clasificación)

³² Fuente: <http://www.interpol.int/es/Centro-de-prensa/Publicaciones>. (Falsificación)

florecente de falsificación de medicamentos que plantea una amenaza cada vez más seria para la salud pública en todo el mundo.

Según el Pharmaceutical Security Institute (organización financiada por la industria farmacéutica), la mayor parte del comercio de medicamentos falsificados se desarrolla en Asia. Pero según la INTERPOL, en todo el mundo hay casos de medicamentos falsificados: "Hay un flujo de productos que llegan de todas partes y salen hacia todas partes, y hay muchísimos centros de distribución."

La amenaza que supone la falsificación de productos farmacéuticos dista mucho de ser una novedad: numerosas autoridades nacionales llevan mucho tiempo luchando contra esas actividades. Si bien la OMS ha venido trabajando sobre esta cuestión compleja y políticamente delicada desde que la Asamblea Mundial de la Salud la abordó por primera vez en 1998, las actividades encaminadas a hacer cumplir la ley se intensificaron a partir de 2006, cuando se creó el Grupo Especial Internacional contra la Falsificación de Productos Médicos (IMPACT),³³ integrado por organizaciones internacionales, organismos encargados de hacer cumplir la ley, la industria farmacéutica y organizaciones no gubernamentales.

Los miembros del grupo IMPACT han venido colaborando estrechamente en investigaciones penales internacionales, prestando asistencia a los países para reforzar sus sistemas de detección y de aplicación de la ley, y colaborando con la industria en la elaboración de diversas medidas, como las relacionadas con el uso de recursos de alta tecnología para aumentar la seguridad de los envases de los medicamentos.

Según una estimación publicada en los EEUU por el Center for Medicine in the Public Interest, en el año 2012 la cifra de ventas de medicamentos falsificados podría ascender a 75.000 millones de dólares de los EEUU, lo que

³³ <http://www.who.int/impact/en/>

equivaldría a un incremento del 90% en cinco años. Resulta difícil determinar la magnitud del problema cuando hay tantas fuentes de información y diferentes definiciones del término "falsificación".

Al igual que el volumen de negocio, tampoco el número de muertes atribuibles a los medicamentos falsificados se conoce con exactitud, pero los costes que entraña para la salud pública son enormes. Aparte de su efecto directo en las personas, estos productos pueden causar resistencia a medicamentos indicados para atacar causas importantes de mortalidad: un ejemplo destacado es el paludismo, enfermedad que se cobra alrededor de un millón de vidas cada año.

Una investigación sobre antipalúdicos falsificados, realizada en el marco de una iniciativa sin precedentes de colaboración internacional, permitió comprobar que la mitad de las 391 muestras recogidas no contenían el principio activo (artesunato) o éste sólo estaba presente en cantidades demasiado pequeñas para resultar eficaces. Los hologramas de los fabricantes no garantizaban la protección, ya que, como observaron los investigadores, los falsificadores habían desarrollado sus propios hologramas falsos. Los resultados de la investigación, publicados en la revista PLoS Medicine en 2008 indicaron que la "epidemia" de medicamentos falsificados en Asia sudoriental había provocado "muertes por paludismo no tratado, reducción de la confianza en este fármaco fundamental, grandes pérdidas económicas para los fabricantes legítimos e inquietud por el posible desarrollo de la resistencia a la artemisinina".

Las Referencias y Estándares Moleculares de biotoxinas (TTX en especial) altamente complejas que permitirán la implementación de nuevas soluciones que involucren el empleo de tecnologías basadas tanto en marcadores químicos como en ratios isotópicos, orientadas al fortalecimiento del arsenal tecnológico dirigido a la lucha contra el fraude y la falsificación de medicamentos y productos cosméticos, permitiendo además el acceso a una valiosa información

derivada de la trazabilidad, análisis y evaluación de los canales y redes de distribución tanto lícitas como ilegales de estas sustancias.

1.2.2. Armas de destrucción masiva (ADM)

La proliferación de armas de destrucción masiva (ADM), especialmente de armas nucleares, químicas y biológicas, y de sus vectores (misiles de medio y largo alcance, misiles de crucero y vehículos aéreos sin piloto) constituye una amenaza creciente. La proliferación de ADM, combinada con la difusión de tecnologías y conocimientos de doble uso, aumenta el riesgo de que estas armas sean utilizadas por Estados, o que las adquieran grupos terroristas.

Las armas químicas no son algo nuevo; ya en el siglo V antes de Cristo (431-404), durante la guerra del Peloponeso entre Esparta y Atenas, se empleó dióxido de azufre, producto asfixiante que obliga a la evacuación de sitios cerrados como cuevas. Pero no es la referencia más antigua, se dice que los chinos, unos mil años antes de Cristo aproximadamente, ya empleaban humos arsenicales con el mismo fin. En el siglo XVI, los alemanes fabricaban bombas pestilentes a base de pezuñas y cuernos de animales molidos, mezclándolos con una resina vegetal pestilente que recibe el nombre de *Asafétida*, para posteriormente prender fuego a la mezcla. Como éstos, abundan los ejemplos.

La historia moderna de las armas químicas comienza el 10 de marzo de 1915, durante la Primera Guerra Mundial, cuando el ejército alemán comenzó a colocar cilindros de gas cloro a lo largo de la línea de trincheras de Ypres, en Bélgica, trabajo que duró poco más de un mes. Esperaron a que el viento soplara fuerte hacia el oeste y, finalmente, el 22 de abril de ese año abrieron las válvulas, liberaron más de 150 toneladas del mortífero gas y provocaron cerca de 10.000 casos de intoxicación y 5.000 muertos. Sólo durante el siglo XX se han llegado a utilizar 70 diferentes productos químicos como arma en diferentes guerras.

Pero los productos químicos no sólo se han utilizado como armas de destrucción masiva durante las guerras, sino también tienen un carácter dual, como agentes antidisturbios permitidos y empleados por las fuerzas y cuerpos de seguridad de los estados en tiempos de paz.³⁴ Los agentes antidisturbios (o gas lacrimógeno) son compuestos químicos que pueden limitar la capacidad de una persona al irritar sus ojos, boca, garganta, pulmones y piel. Estos agentes se emplean para controlar multitudes y como un apoyo a el entrenamiento de los militares (para probar la velocidad y habilidad para ponerse una máscara de gas en un tiempo determinado).

Según el Centro para el control y prevención de enfermedades (Center for Disease Control and prevention, CDC),³⁵ los agentes antidisturbios más importantes son: Cianuro de bromobencilo (CA), Cloroacetofenona (CN), Clorobencilidenmalononitrilo (CS), Cloropicrina (PS), Dibenzoxacepina (CR), Vanillilamida del ácido pelargónico (PAVA), Oleorresina *Capsicum* (OC).

En los últimos años, los productos químicos vienen siendo utilizados en acciones terroristas, como la explosión de una bomba en Nueva York en 1993, que se encontraba cargada de cianuro. Afortunadamente la propia deflagración inactivó el cianuro. Más reciente en el tiempo encontramos los ataques sufridos en diferentes ciudades japonesas, como el ataque con gas sarín en el metro de Tokio en 1995, donde se puso a prueba la capacidad de reacción de los servicios de emergencias ante una catástrofe de semejante magnitud. Actualmente y tras los atentados del 11 de septiembre de 2001 en la ciudad de Nueva York, ha crecido de forma notable la preocupación y el temor a nivel mundial sobre la posibilidad

³⁴ De hecho, su uso en periodos de guerra supondría una violación de la Convención Internacional Sobre las Armas Químicas.

³⁵ El CDC es una de las entidades operativas más importantes del Department of Health (DoH) de los EEUU. Ver: <http://www.cdc.gov/about/organization/cio.htm>

de sufrir ataques terroristas con armas de destrucción masiva, ya sean biológicas, atómicas o químicas. Los agentes químicos (vesicantes, nerviosos,...) y biológicos (bacterias, virus y hongos) son mucho más fáciles de producir, manipular y transportar que las armas nucleares o convencionales, y resultan mucho más baratos. Son difíciles de detectar y los síntomas que provocan pueden tardar horas o días en manifestarse.

Las últimas tendencias del terrorismo apuntan a un mayor interés por el uso de armas químicas y biológicas, que constituyen un medio eficaz de infundir un miedo generalizado entre los ciudadanos. A lo largo de la historia se han dado muchos casos de utilización o amenaza de uso de toxinas o agentes patógenos, y hay pruebas evidentes de que en los últimos tiempos ha habido personas y organizaciones terroristas que han realizado investigaciones sobre toxinas y agentes biológicos, o que han intentado adquirir este material.

El hecho de hacer frente a los peligros que plantean los posibles terroristas precisa de la cooperación internacional a varios niveles: desde la elaboración y aplicación de leyes adecuadas, a fin de penalizar los actos de terrorismo, hasta la creación de equipos y estrategias para poder reaccionar ante situaciones de emergencia a escala local y nacional.

Según la Convención sobre la Prohibición del Desarrollo, la Producción, el Almacenamiento y el Empleo de Armas Químicas y su Destrucción, hecha en París el 13 de enero de 1993,³⁶ por "armas químicas" se entiende, conjunta o separadamente:

a) Las sustancias químicas tóxicas o sus precursores, salvo cuando se destinen a fines no prohibidos por la presente Convención, siempre que los tipos y cantidades de que se trate sean compatibles con esos fines.

³⁶ Desarrollada por la Organización para la Prohibición de la Armas Químicas (OPAQ).

b) Las municiones o dispositivos destinados de modo expreso a causar la muerte o lesiones mediante las propiedades tóxicas de las sustancias especificadas en el apartado a) que libere el empleo de esas municiones o dispositivos.

c) Cualquier equipo destinado de modo expreso a ser utilizado directamente en relación con el empleo de las municiones o dispositivos especificados en el apartado b).

Por "sustancia química tóxica" se entiende toda sustancia química que, por su acción química sobre los procesos vitales, pueda causar la muerte, la incapacidad temporal o lesiones permanentes a seres humanos o animales. Quedan incluidas todas las sustancias químicas de esa clase, cualquiera que sea su origen o método de producción y ya sea que se produzcan en instalaciones, como municiones o de otro modo. (A los efectos de la aplicación de dicha Convención, las sustancias químicas tóxicas respecto de las que se ha previsto la aplicación de medidas de verificación están enumeradas en Listas incluidas en los Anexos sobre sustancias químicas.)

Por "precursor" se entiende cualquier reactivo químico que intervenga en cualquier fase de la producción por cualquier método de una sustancia química tóxica. Queda incluido cualquier componente clave de un sistema químico binario o de multicomponentes. (A los efectos de la aplicación dicha Convención, los precursores respecto de los que se ha previsto la aplicación de medidas de verificación están enumerados en Listas incluidas en los Anexos sobre sustancias químicas.)

Por "componente clave de sistemas químicos binarios o de multicomponentes" (denominado en lo sucesivo "componente clave") se entiende el precursor que desempeña la función más importante en la determinación de las propiedades tóxicas del producto final y que reacciona rápidamente con otras sustancias químicas en el sistema binario o de multicomponentes.

De su aplicación internacional se encarga la Organización para la Prohibición de las Armas Químicas (OPAQ), cuya sede se encuentra en La Haya, mientras que en España es La Autoridad Nacional para la Prohibición de las Armas Químicas (ANPAQ)³⁷ la que se encarga de su supervisión. Las armas químicas están clasificadas de acuerdo a las indicaciones de la OPAQ:³⁸

Lista 1: todas aquellas sustancias que han sido utilizadas o pueden ser fácilmente utilizadas como armas químicas y que tienen una escasa o nula utilidad para fines pacíficos. Estas sustancias están sometidas a unas restricciones muy estrictas, con un límite máximo de producción de una tonelada anual por Estado Parte, una cantidad máxima de armas químicas poseídas en un momento determinado de una tonelada por Estado Parte, requisitos para las licencias y restricciones sobre las transferencias. Estas restricciones se aplican a las relativamente pocas instalaciones industriales que utilizan sustancias químicas de la Lista 1. Algunas sustancias químicas de la Lista 1 se utilizan como ingredientes para preparados farmacéuticos o de diagnóstico. La saxitoxina (STX), sustancia química de la Lista 1, *se utiliza como testigo de calibración en programas de vigilancia de la intoxicación paralizante por consumo de moluscos*, y también se utiliza en *investigaciones neurológicas*. El ricino, otra sustancia química de la Lista 1, ha servido de instrumento para la investigación biomédica. *Algunas sustancias químicas de la Lista 1 o sus sales se utilizan como agentes antineoplásicos en medicina*. Otras sustancias químicas de la Lista 1 se producen y se utilizan frecuentemente con fines de protección, como por ejemplo para probar equipos de protección contra las armas químicas y alarmas contra agentes químicos. Algunas sustancias que han estado incluidas en la Lista 1, como la

³⁷ La ANPAQ se constituyó mediante el Real Decreto 663/1997, de 12 de mayo, que reguló su composición y funciones.

³⁸ Ver: <http://www.opcw.org/sp/>

tetrodotoxina (TTX), fueron excluidas debido a su aplicación en el mercado de la salud.

Lista 2: entre las sustancias químicas de la Lista 2 se encuentran aquellas que son precursores de agentes de armas químicas o que, en ciertos casos, pueden ser utilizados como tales, pero que tienen otras utilidades comerciales (como por ejemplo ingredientes de resinas, pirorretardantes, aditivos, tintas y tintes, insecticidas, herbicidas, lubricantes y algunas materias primas para la fabricación de productos farmacéuticos). Por ejemplo, el BZ es una sustancia química neurotóxica enumerada en la Lista 2, que también es un producto industrial intermedio para la producción de fármacos como el bromuro de clindinio. El tiodiglicol es tanto un precursor del gas mostaza como un ingrediente de las tintas al agua, de los tintes y de algunas resinas. Otro ejemplo de este tipo es el metilfosfonato de dimetilo, sustancia química relacionada con varios precursores de agentes neurotóxicos que se utiliza como pirorretardante en productos textiles y espumas de plástico.

Lista 3: en las sustancias químicas de la Lista 3 se incluyen aquellas sustancias que no pueden ser utilizadas como armas químicas o para producir armas químicas, pero que se utilizan habitualmente con fines pacíficos (incluida la fabricación de plásticos, resinas, sustancias químicas de minería, fumigantes para el refinado del petróleo, pinturas, revestimientos, agentes antiestáticos y lubricantes). Entre las sustancias químicas tóxicas de la Lista 3 se encuentran el fosgeno y el cianuro de hidrógeno, que se han utilizado como armas químicas, pero que también se utilizan para la producción de resinas de policarbonato, de plásticos de poliuretano y de algunas sustancias químicas agrícolas. La trietanolamina, precursor del gas mostaza de nitrógeno, se encuentra presente en varios productos detergentes (incluidos champús, espumas de baño y productos de limpieza para el hogar), y también se utiliza para desulfurizar los flujos de gas combustible.

Sustancias químicas orgánicas definidas (SQOD)

Entre las sustancias químicas no enumeradas en las Listas ni en ninguna parte de la Convención se encuentran las sustancias químicas orgánicas definidas (SQOD). Las operaciones de fabricación que producen SQOD son denominadas “otras instalaciones de producción de sustancias químicas”. Estos complejos industriales son objeto de declaraciones y de requisitos de verificación si en ellos se produce un total de más de 200 toneladas anuales de SQOD. También están sujetos a estos requisitos cuando comprenden plantas en las que se producen más de 30 toneladas de cualquier SQOD que contenga fósforo, azufre o flúor (sustancias químicas PSF). Miles de complejos industriales de este tipo han sido declarados a la Secretaría Técnica.

Al igual que en el caso de las drogas, el control eficaz del uso de los productos químicos que podrían ser utilizados en la fabricación ilícita de ADM, constituye un arma fundamental contra esta amenaza creciente. Estos productos químicos, denominados precursores, también tienen a menudo una aplicación industrial legal y legítima. Por lo tanto, debe admitirse y protegerse el comercio legítimo de dichas sustancias, impidiendo que se desvíen hacia fines ilícitos.³⁹

1.2.3. Materiales de referencia (MR)

Actualmente en el mercado existe un creciente interés por implantar en los laboratorios de análisis normas de gestión de la calidad como la Norma ISO 9000 o la Norma ISO 17025. En cualquier sistema de calidad deben existir acciones basadas en el contraste sistemático de las actividades implicadas en el

³⁹ Estrategia Europea contra la proliferación de armas de destrucción masiva; Bruselas, 12 de diciembre de 2003.

control de calidad, y para ello, en los laboratorios de ensayo es útil e importante emplear materiales de referencia.⁴⁰

En España, por ejemplo, el LRUEBM⁴¹ es el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea de Biotoxinas Marinas. Como tal, coordina las actividades de la red de Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR), establecidos en cada uno de los Estados Miembros de la UE, en cuestiones relacionadas con la metodología aplicada al control de las biotoxinas marinas en moluscos, con objeto de proteger la salud pública y garantizar un elevado nivel de seguridad alimentaria a los consumidores. El Laboratorio de Biotoxinas Marinas de Vigo (España) fue designado como LCRBM en 1993. Desde 2004, el LRUEBM pertenece a la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición del Ministerio de Sanidad y Política Social.

Las funciones de los Laboratorios Comunitarios de Referencia están establecidos en el artículo 32 del Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 y, esencialmente, son:

⁴⁰ a) <http://www.iat.es/simce/html/subidas/descarga/mr.pdf> : M^a Teresa López; *Materiales de Referencia*; Centro Nacional de Metrología; b) Guía ISO 30:1992 Términos y definiciones utilizadas en conexión con los MR; c) Guía ISO 31:2000 Materiales de referencia. Contenido de los certificados y etiquetas; d) Guía ISO 32:1997 Calibración en análisis químico y uso de los materiales de referencia certificados; e) Guía ISO 33:2000 Utilización de los materiales de referencia certificados; f) Guía ISO 34:2000 Requisitos generales para la competencia de los fabricantes de materiales de referencia; g) Guía ISO 35:1989 Certificación de los materiales de referencia. Principios generales y estadísticos; h) Guía ISO 43-1:1997 Test de aptitud por comparación interlaboratorios. Parte 1: Desarrollo y operación de los esquemas de test de aptitud; i) Guía ISO 43-2:1997 Test de aptitud por comparación interlaboratorios: Parte 2: Selección y uso de esquemas de test de aptitud por los organismos de acreditación de laboratorios; j) Guía para la producción y certificación de materiales de referencia de BCR; k) OIML Documento internacional n° 18. Principios generales de utilización de los materiales de referencia certificados en las medidas; l) Calibración en el análisis químico y utilización de los materiales de referencia certificados. Alain Marschal. Laboratorio Nacional de Ensayos (Francia); m) Vocabulario Internacional de Metrología. Centro Español de Metrología. Ministerio de Fomento.2000; n) CEM (Centro Español de Metrología); <http://www.cem.es>.

⁴¹ http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/sobre_aesan/seccion/laboratorio_comunitario_referencia.shtml.

a) Proporcionar a los laboratorios nacionales de referencia los detalles de los métodos analíticos, en especial de los métodos de referencia.

b) Coordinar la aplicación de los métodos mencionados en la letra a) por parte de los laboratorios nacionales de referencia, en particular organizando la realización de ensayos comparativos y realizando su adecuado seguimiento de acuerdo con protocolos internacionalmente aceptados, si están disponibles.

c) Coordinar, en su ámbito de competencias, la organización práctica necesaria para aplicar nuevos métodos de análisis e informar a los laboratorios nacionales de referencia de los avances en este campo.

d) Organizar cursos de formación inicial y continua dirigidos al personal de los laboratorios nacionales de referencia y a expertos de países en desarrollo.

e) Proporcionar a la Comisión asistencia científica y técnica, sobre todo en los casos en que un Estado miembro cuestione los resultados de los análisis.

f) Colaborar con los laboratorios encargados de analizar los piensos y los alimentos en terceros países.

La utilización de Materiales de Referencia (MR) es una necesidad y una exigencia, tanto en los laboratorios de ensayo como de calibración. La implantación de un sistema de calidad en un laboratorio lleva implícito asegurar, entre otros aspectos, la calidad y la bondad de los resultados de las medidas, y que puedan demostrarse. Se debe poder garantizar la trazabilidad de los resultados obtenidos, tanto en calibración como en los ensayos.

Los Materiales de Referencia permiten transferir valores del mensurando tanto físicos, como químicos, biológicos o técnicos de un lugar a otro. El papel de los MR es primordial y creciente en varios campos de actividad, siendo entre otros: Las actividades nacionales e internacionales de normalización, los ensayos de aptitud y en la acreditación de laboratorios.

En la actualidad hay un número creciente de productores de materiales de referencia y la demostración de su competencia técnica es ya una necesidad si se quiere asegurar la calidad de los materiales puestos en el mercado. Por otra parte, existe un constante aumento en la exigencia de disponer de nuevos materiales de referencia de mayor calidad, debido tanto al constante aumento en la precisión de los instrumentos de medida, como en la exigencia cada vez mayor de los diferentes ámbitos científicos y técnicos de recibir datos cada vez más fiables. Por tanto, en la actualidad, es necesario que los productores de materiales de referencia no solamente suministren información sobre sus materiales en forma de informes o certificados, sino también que demuestren que disponen de la necesaria competencia técnica para producirlos. Todo lo hasta ahora expuesto, es especialmente aplicable a *Referencia y Estándares Moleculares* de biotoxinas, en especial a TTX y análogos.

Por esta razón desde hace ya algún tiempo algunas entidades de acreditación tanto europeas como de otras partes del mundo han venido acreditando a este tipo de organizaciones usando como referencia la Guía ISO 34 “Requisitos generales sobre la competencia técnica de los productores de materiales de referencia”, esto está haciendo que los productores de esos países estén haciendo valer dicha acreditación para obtener una ventaja competitiva en el mercado. Por esa razón desde diversas instancias se ha transmitido a ENAC la necesidad de que los productores de materiales de referencia españoles tuviesen a su disposición este servicio.

Por todo ello, ENAC decidió en 2011 iniciar las actividades de acreditación de productores de materiales de referencia de acuerdo a los requisitos establecidos en la Guía ISO 34. Este esquema de acreditación, por su novedad, se va a lanzar primero en fase piloto lo cual implica que tanto el proceso de evaluación como los plazos se ven modificados frente a un proceso de evaluación estándar.

A continuación se enumeran varios de los productores destacados de MR a nivel internacional:

a) NRC-CRM (Institute for Marine Bioscience, National Research Council; NRC, Canada), Certified Reference Material Program.

b) NIST (National Institute of Standards and Technology) (Estados Unidos)

c) COMAR (Code Materiux Reference): Es una base de datos internacional (Francia).

d) BCR (Bureau Communautaire de Reference) ahora lo certifica el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) (Bruselas).

e) LGC (Laboratory of the Government Chemist) (Reino Unido).

f) NPL (National Physical Laboratory) (Reino Unido).

CAPÍTULO 2

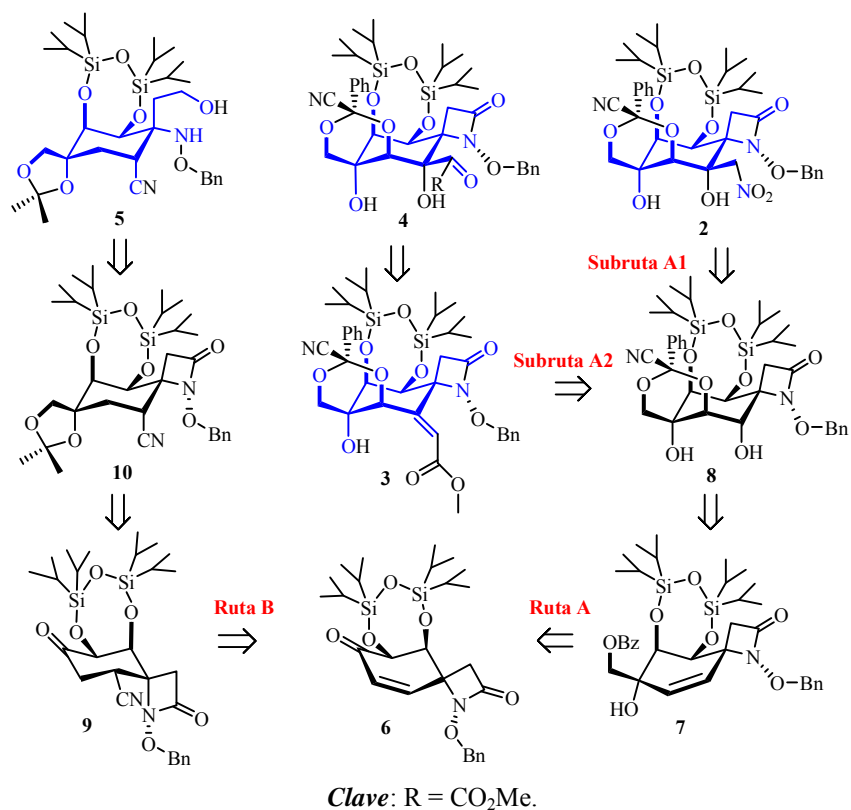
SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL CORE DE TETRODOTOXINA

2. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL CORE DE TETRODOTOXINA

2.1. Preparación del producto de partida de las dos rutas:

Síntesis de la ciclohexenona-espiro-β-lactama **6**¹

Para llevar a cabo la síntesis total de los análogos sintéticos (compuestos **2-5**, Esquema 2.1.1) del *core* de la tetrodotoxina se utiliza la ciclohexenona **6** como producto de partida.

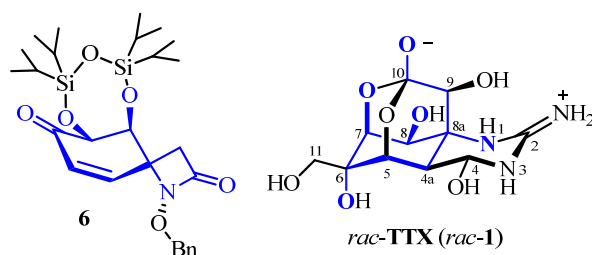


Esquema 2.1.1. Esquema retrosintético de los análogos de *rac*-TTX (*rac*-1) (se resalta en color azul el *core* de TTX).

¹ Todos los compuestos de la presente Memoria se encuentran recogidos en las patentes mostradas en el Anexo C

A partir de la ciclohexenona **6**, se puede llevar a cabo la incorporación temprana de C-11 y tardía de C-4 (Ruta A, Esquema 2.1.1), o bien, la incorporación temprana de C-4 y tardía de C-11 (Ruta B, Esquema 2.1.1).

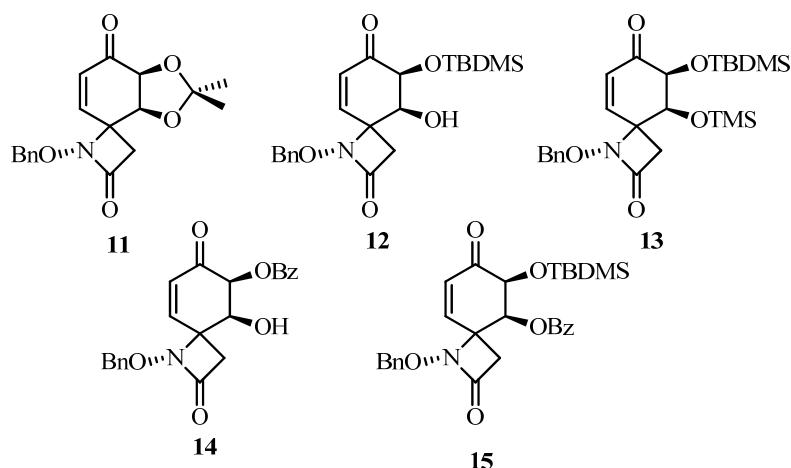
La ciclohexenona **6** presenta en su esqueleto ocho carbonos (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9 y C-10) de los once carbonos presentes en *rac*-**1**, el futuro nitrógeno N-1, las posiciones oxigenadas C-7 y C-8 con una disposición estereoquímica *trans* respecto al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en la *rac*-TTX. El puente carbonado C(9)-C(10) de *rac*-TTX (*rac*-**1**) y su nitrógeno de la posición N-1 se encuentran enmascarados como una β -lactama. (Esquema 2.1.2).



Esquema 2.1.2. Relación estructural entre la ciclohexenona **6** y la *rac*-TTX (*rac*-**1**) (en color azul se muestra su esqueleto común).

En la aproximación sintética de esta tesis, la ciclohexenona **6** se utiliza como producto de partida porque es un producto estable, que se obtiene con buen rendimiento a partir de productos comerciales asequibles y baratos y posee la funcionalidad adecuada para incorporar tanto el oxígeno de la posición C-5 como de los carbonos C-2, C-4 y C-11 que se encuentran en *rac*-TTX (*rac*-**1**). Otros productos evaluados como sustratos de partida requieren adicionales etapas de protección o son inestables (Esquema 2.1.3).²

² Para su descripción ver: *Parte Experimental*.

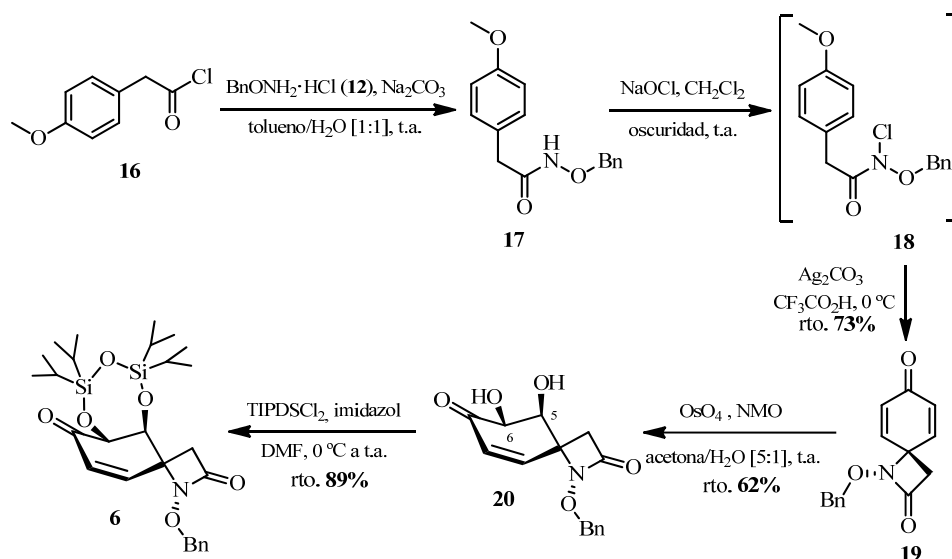


Esquema 2.1.3. Sustratos de partida evaluados.

La secuencia sintética para obtener la ciclohexenona **6**, consta de 5 etapas: 1) Preparación de la *N*-benciloxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (**17**), amida tipo Weinreb³; 2) Preparación *in situ* de *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**; 3) Preparación de β -lactama **19** mediante ciclación intramolecular con desaromatización oxidativa de la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**; 4) Preparación del 1,2-diol **20**; 5) Protección del diol con el grupo protector bifuncional TIPDS (Esquema 2.1.4).⁴

³ (a) Nahm, S.; Weinreb, S.M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3815-3818. (b) Singh, J.; Satyamurthi, N.; Aidhen, I.S. *J. Prakt. Chem.* **2000**, 342, 340. (c) De Luca, L.; Giacomelli, G.; Taddel, M. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2534-2537.

⁴ El grupo TIPDS es un grupo protector bifuncional basado en silicio, voluminoso y bastante estable frente a medios ácidos y básicos, que es utilizado para proteger 1,2- y 1,3-dioles. (a) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2007. pp.: 356-360. (b) Para el primer ejemplo de protección de dioles con TIPDS-Cl₂, ver: Markiewicz, W.T. *J. Chem. Res. Synop.* **1979**, 24-25. (c) Como ejemplo de protección de dioles cíclicos, ver: Schaumburg, J. P.; Hokanson, G. C.; French, J. C. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 1651-1656.



Esquema 2.1.4. Esquema sintético de la preparación de la ciclohexenona 6.

2.1.1. Preparación de *N*-benciloxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (17)

La reacción de cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (**16**)⁵ y clorhidrato de *O*-bencilhidroxilamina⁶ y carbonato sódico conduce a la formación de la *N*-alcoxiámida de bencilo **17**, como un sólido blanco, con un rendimiento del 99%. (Esquema 2.1.4).⁷

⁵ Aldrich, 10 g, 50.4 € (mayo de 2012).

⁶ Aldrich, 25 g, 145.5 € (mayo de 2012).

⁷ a) Utilizando el mismo procedimiento se han preparado las siguientes *N*-cloro-alcoxiámidas: *N*-metoxi-2-(4metoxifenil)acetamida, *N*-(*O*-alidroxi)-2-(4metoxifenil)acetamida y (-)-(*S*)-(1-feniletoksi)-2-(4metoxifenil)acetamida. Todas con rendimiento cuantitativo. Ver: Noheda, P.; Bernabé, M.; Maroto, S.; Tabarés, N. Spirolactams and their Synthesis. Patent WO 2005108356, Nov 17, 2005.

2.1.2. Preparación de *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** y de la ciclohexadienona-espiro- β -lactama **19**⁸

La reacción de la *N*-benciloxi-2-(4-metoxifenil)acetamida **17** con lejía,⁹ en ausencia de luz¹⁰ y usando diclorometano como disolvente, conduce a la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** con un rendimiento cuantitativo. (Esquema 2.1.4).¹¹

No es necesario aislar la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**, para llevar a cabo la siguiente reacción, pero se puede aislar como un sólido amarillo después de separar las fases en ausencia de luz, desechar la fase acuosa y concentrar a presión reducida la fase orgánica.

El tratamiento de la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** con carbonato de plata¹² y ácido trifluoroacético (TFA) genera la β -lactama **19** con un rendimiento del 73%, recuperándose un 1% de la *N*-alcoxiamida **17**. (Esquema 2.1.4).¹³

⁸ a) La β -lactama **19** también se puede preparar por oxidación directa de la *N*-benciloxi-2-(4-metoxifenil)acetamida (**17**) con PIFA en diclorometano, pero la mezcla de reacción es compleja y el rendimiento disminuyen desde el 73% al 36%.

⁹ a) Lejía comercial Mavy® (máxima concentración 5% p/v de hipoclorito sódico). Los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza lejía de una botella recién abierta. b) Se puede usar hipoclorito de *tert*-butilo como oxidante en lugar de lejía, pero debe prepararse en el momento de ser usado, en la oscuridad por reacción de lejía y una disolución ácida de alcohol *tert*-butilico.

¹⁰ Se protege el matraz de reacción con una camisa de papel de aluminio ya que la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** es fotosensible y descompone con la luz.

¹¹ a) Rendimiento obtenido sin aislar la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** y calculado teniendo en cuenta el siguiente paso de reacción. La reacción se da por terminada cuando por TLC (hexano/AcOEt, 1:2) desaparece la *N*-alcoxiamida **17** y se observa un único producto de *R*_f: 0.83 correspondiente a la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**. b) Utilizando el mismo procedimiento se han preparado las *N*-cloro-*N*-alcoxiamidas: *N*-cloro-*N*-metoxi-2-(4metoxifenil)acetamida, *N*-cloro-*N*-(*O*-alilhidroxi)-2-(4metoxifenil)acetamida y (-)-(*S*)- *N*-cloro-*N*-(1-feniletoxi)-2-(4metoxifenil)acetamida. Ver: Noheda, P.; Bernabé, M.; Maroto, S.; Tabarés, N. Spirolactams and their synthesis. Patent WO 2005108356, Nov 17, 2005.

¹² a) Kawase, M.; Kitamura, T.; Kikugawa, Y. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 3394-3403. (b) Glover, S.A.; Goosen, A.; McClelland, C.W.; Schoonraad, J.L. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2577-2592.

¹³ a) Rendimientos obtenidos sin aislar la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**. Si se aísla, el rendimiento de la reacción disminuye hasta un 58% y se recupera un 6% de la *N*-alcoxiamida **17**. b) Utilizando el mismo procedimiento se han preparado las siguientes ciclohexadienona-espiro- β -lactama: 1-metoxi-1-azaspiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona, 1-(*O*-alilhidroxi)-1-azaspiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona y (-)-1-(1-feniletoxi)-1-azaspiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona con

La β -lactama **19**, que presenta un sustituyente bencilo, es especialmente estable al igual que la que presenta un sustituyente metilbencilo¹⁴ y a diferencia de otras β -lactamas, como las que presentan un sustituyente metilo o alilo¹⁵. Por lo que el aumento de estabilidad de estas espiro- β -lactamas está relacionado con el grupo bencilo que presentan.

La difracción de rayos X¹⁶ de la β -lactama **19** confirma su estructura de ciclohexadienona-espiro- β -lactama. En la Figura 2.1.2.1, se muestra la numeración de los átomos¹⁷ y una representación de la molécula teniendo en cuenta los valores obtenidos para las coordenadas atómicas.¹⁸

El anillo de seis miembros C1-6 presenta una conformación tipo bote, mientras que el anillo de β -lactama es casi plano, siendo el ángulo de torsión C7-C8-N-C4 de $\pm 7.5(4)^\circ$.¹⁹ El anillo de benceno del grupo *N*-benciloxi es plano y se dispone *anti* respecto al nitrógeno, como sugiere el ángulo de torsión N-O3-C9-C10 de $\pm 177.2(3)^\circ$. Además, presenta los siguientes ángulos de torsión: C4-N-O3-C9 de $\pm 107.4(4)^\circ$; O3-C9-C10-C11 de $\pm 107.3(4)^\circ$; y N-C4-C3-C2 de $\pm 138.6(3)^\circ$.

rendimientos del 43%, 68% y 65% respectivamente y recuperándose en cada caso las *N*-alcoxiámidas de partida en un 16%, 2% y 3% respectivamente. Ver: Noheda, P.; Bernabé, M.; Maroto, S.; Tabarés, N. Spirolactams and their synthesis. Patent WO 2005108356, Nov 17, 2005.

¹⁴ Ambas β -lactamas se pueden almacenar a temperatura ambiente durante meses.

¹⁵ Estas β -lactamas se pueden almacenar bajo atmósfera de argón en el refrigerador (4 °C) durante semanas.

¹⁶ La resolución de la estructura de **19** por difracción de rayos X fue realizada por el Dr. Xavier Solans del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Depósitos Minerales de la Universidad de Barcelona, empleando los difractómetros *Enraf-Nonius CAD4* y *MarResearch MAR345* con detector *Image plate*, respectivamente, y el programa *SHELXL-97*.

¹⁷ En la discusión de los datos cristalográficos de **19**, se empleará la misma numeración de átomos que la establecida al obtener su estructura por difracción de rayos X, ver: Figura 2.1.2.1.

¹⁸ Las coordenadas atómicas obtenidas para **19** se resumen en la Tabla A.2 del *Anexo A* de la presente Memoria.

¹⁹ En la celda de esta estructura la mitad de las moléculas tienen ángulos de torsión de signo cambiado a la otra mitad.

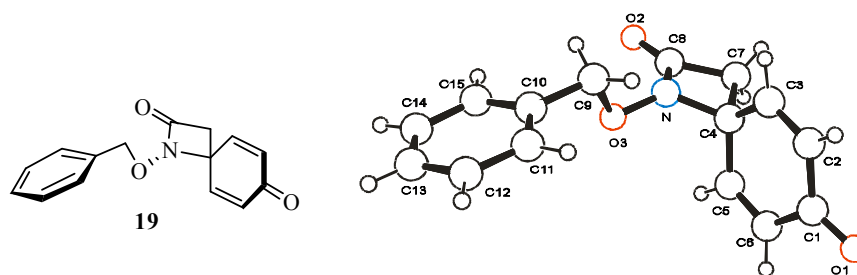


Figura 2.1.2.1. Representación de la estructura molecular de la β -lactama **19** obtenida por difracción de rayos X.

En estado sólido la β -lactama **19** no presenta interacciones π - π “cara a cara” entre anillos (la distancia más corta entre el centro de los anillos corresponde a 4.555 Å entre dos β -lactamas C4-C7-C8-N). Sin embargo, existe una ligera interacción intermolecular C-H... π “en forma de T” de los enlaces C11-H11 y C14-H14 con los anillos aromáticos de otras dos moléculas, siendo las distancias H...anillo de 3.28 y 3.29 Å, respectivamente.

Una selección de datos espectroscópicos asignados a la *N*-alcoxiámida **17** y β -lactama **19** se muestran a continuación. (Figura 2.1.2.2).²⁰

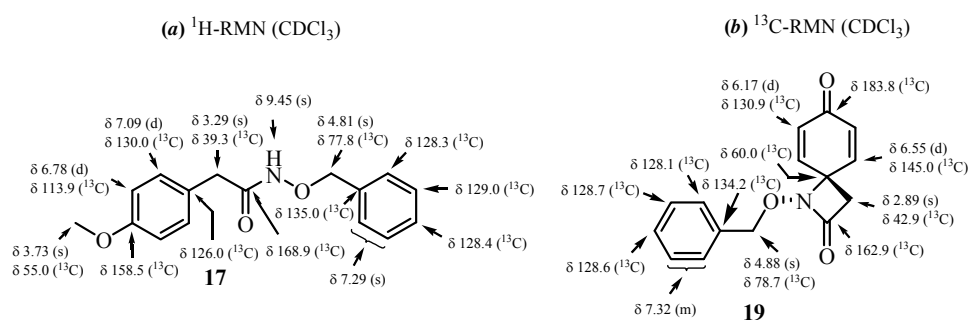
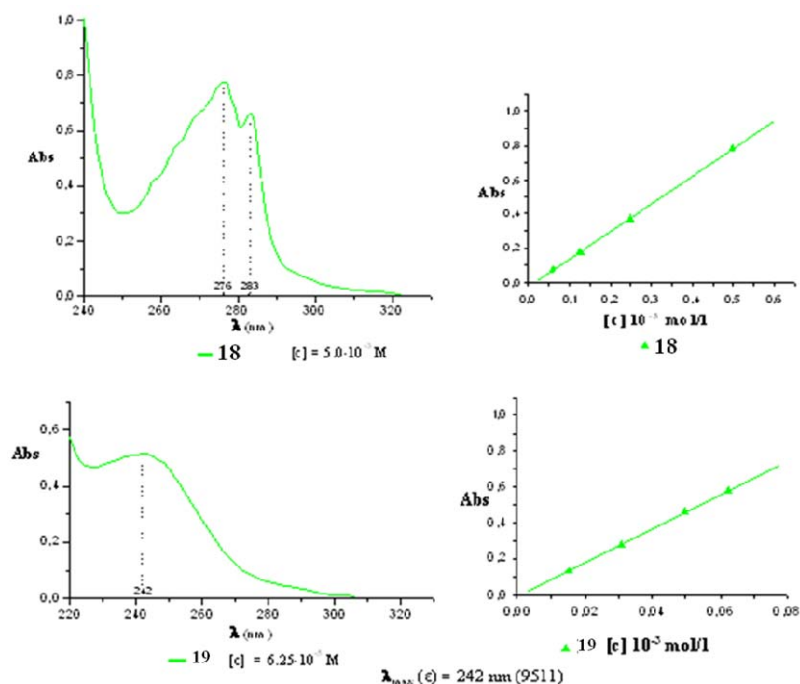


Figura 2.1.2.2. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la *N*-alcoxiámida **17** y la β -lactama **19**.

²⁰ Ver los datos en la *Parte Experimental* de la presente Tesis Doctoral.

En el espectro de UV de la β -lactama **19** en MeOH (Figura 2.1.2.3), se observa un máximo de absorción a una longitud de onda de 242 nm (9511).²¹ Los datos de absorbancia obtenidos a distintas concentraciones, se ajustan a la Ley de Lambert-Beer²² (Figura 2.1.2.3). Además, la dilución en la que se ha registrado el espectro, del orden de 10^{-5} mol/l, sugiere que no se produce agregación intermolecular.



Clave: Abs = absorbancia; [c] = concentración (M); λ_{\max} = longitud de onda del máximo de absorción (nm); ϵ = coeficiente extinción molar ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Figura 2.1.2.3. Espectros de UV en MeOH y representación de la ecuación de Lambert-Beer para la amida **17** y la β -lactama **19**.

²¹ Entre paréntesis se indica el valor del coeficiente de extinción molar (ϵ), calculado experimentalmente de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer. La unidad en la que está expresada $\lambda_{\max}(\epsilon)$ es nm ($\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

²² Rao, C.N.R. *Ultra-violet and Visible Spectroscopy*; Butterworths: London, 1961.

En estado sólido, no existen interacciones π - π “cara a cara” entre anillos, mientras que en disolución se observa una fuerte interacción electrónica estabilizante intramolecular²³ entre la nube π del anillo aromático (donador) y la nube π de la ciclohexadienona (aceptor) de la β -lactama **19** en la conformación mostrada en la Figura 2.1.2.4.²⁴

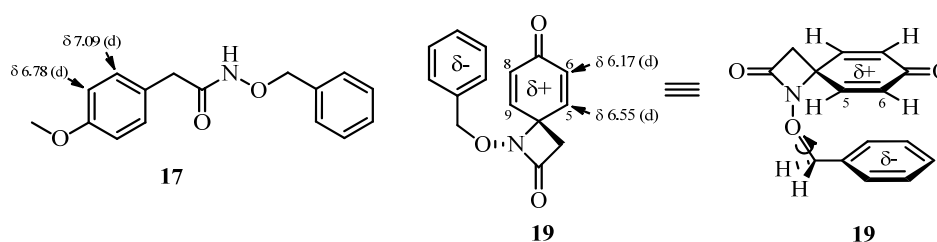


Figura 2.1.2.4. Interacción donador-aceptor intramolecular propuesta para la β -lactama **19**.

Por otro lado, en el espectro de ^1H -RMN de la β -lactama **19**, se observa un fuerte apantallamiento de sus protones olefínicos, imputable al efecto del anillo aromático (Figura 2.1.2.5).

²³ Se propone que la interacción π - π es intramolecular teniendo en cuenta la dilución en la que se han registrado los espectros y el buen ajuste de los datos a la ley de Lambert-Beer.

²⁴ Esta interacción π - π estabilizante entre anillos puede ser la responsable de la especial estabilidad observada para la *N*-benciloxi-espiro- β -lactama **19**.

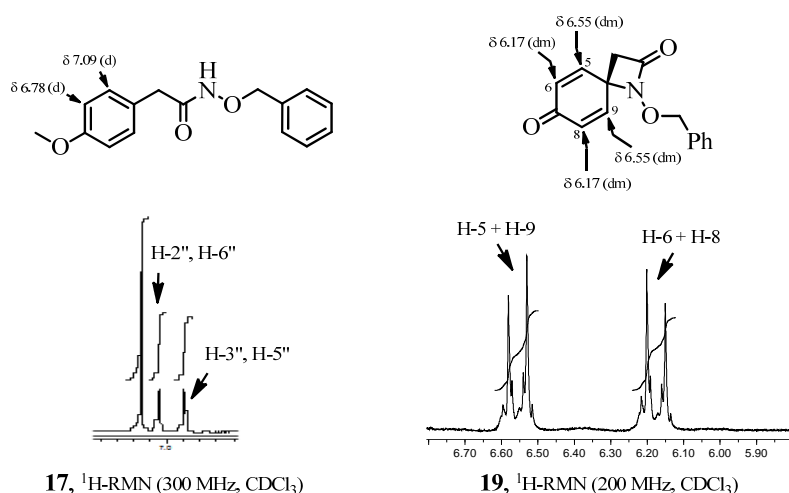


Figura 2.1.2.5. Detalle del espectro de ^1H -RMN de la N-alcoxiámida **17** y de la β -lactama **19**.

Por consiguiente, tanto del espectro de UV como de ^1H -RMN, se puede deducir que la conformación más poblada de la β -lactama **19** en disolución es la indicada en la Figura 2.1.2.4, en la cual la cara β del anillo de ciclohexadienona²⁵ está ocupada preferentemente por el sustituyente bencilo.

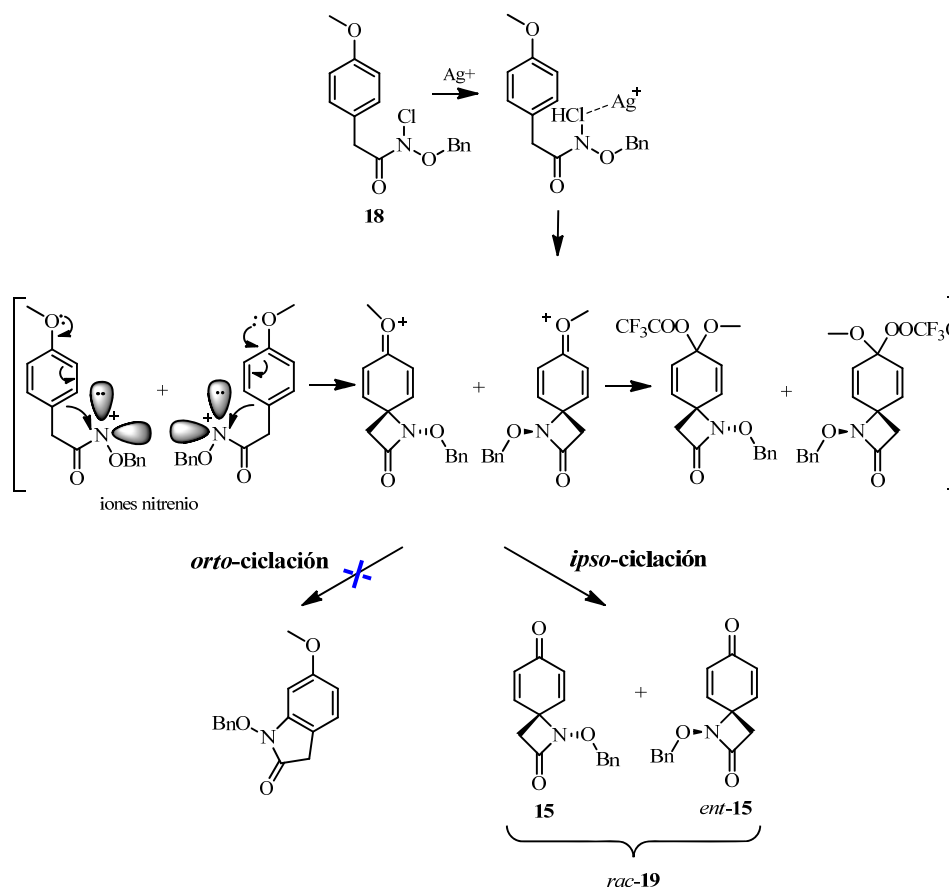
La β -lactama **19** se forma mediante la ciclación intramolecular de un ión nitrenio estabilizado.²⁶ Dicho ión se genera por el tratamiento de la N-cloro-N-alcoxiámida **18** con carbonato de plata.²⁷ Una vez generado el ion nitrenio, se

²⁵ Las caras α y β del anillo de ciclohexadienona de la β -lactama **19** se definen según lo establecido en el apartado de *Nomenclatura* de la presente Memoria.

²⁶ a) Kikugawa, Y.; Kawase, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 5728-5729. (b) Glover, S.A.; Goosen, A.; McClelland, W.; Schoonraad, J.L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1984**, 2255-2260. (c) Glover, S.A.; Rowbottom, C.A.; Scott, A.P.; Schoonraad, J.L. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 7247-7262.

²⁷ Otros métodos de preparación del ión nitrenio son utilizando otras sales de metales de transición como acetato de zinc (Ver Kikugawa, Y.; Shimada, M.; Matsumoto, K. *Heterocycles* **1994**, *37*, 293-301) o a mediante una oxidación con compuestos de iodo hipervalente como PIFA ((a) Kikugawa, Y.; Nagashima, A.; Sakamoto, T.; Miyazawa, E.; Shiiya, M. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6739-6744. (b) Kikugawa, Y.; Kawase, M. *Chem. Lett.* **1990**, 581-582) o HTIB ((a) Miyazawa, E.; Sakamoto, T.; Kikugawa, Y. *Heterocycles* **2003**,

produce el ataque electrófilo intramolecular de éste sobre la posición *ipso* del grupo arilo que soporta a la amida, dando lugar a la correspondiente β -lactama **19** (Esquema 2.1.2.1).



Esquema 2.1.2.1. Ciclación de los dos iones *N*-alcoxi-*N*-acilnitrenio basado en la propuesta mecanística de Kikugawa y col.

59, 149-160. (b) Wardrop, D.J.; Burge, M.S.; Zhang, W.; Ortíz, J.A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2587-2591).

La amida tipo Weinreb **17** empleada como sustrato de partida presenta sustituyentes electrón donadores (un grupo metoxilo en la posición *para* aromática y un grupo bencilo sobre el nitrógeno amídico) con el fin de promover el ataque *ipso* de los iones nitrenio necesario para la formación de la β -lactama **19**.

Según la propuesta mecanística de Kikugawa y col.²⁸ para este tipo de reacciones (Esquema 2.1.2.1), los cationes de Ag^+ inducen la heterólisis del enlace N-Cl generando dos iones *N*-alcoxi-*N*-acilnitrenios. Estos iones nitrenio, estabilizados por los grupos alcoxilo y acilo, atacan intramolecularmente la posición *ipso* del anillo aromático debido a que la densidad electrónica en esta posición se incrementa por la presencia de un sustituyente electrón-donador (grupo metoxilo) en *para*. A continuación, el disolvente (TFA) captura los intermedios catiónicos de tipo Wheland y la posterior hidrólisis, con pérdida de metanol, generando mediante una ciclación intramolecular electrófila 4-*exo-tet* la β -lactama **19** y su enantiómera la *ent*- espiro- β -lactama **19**. El ión nitrenio origina la generación de un centro estereogénico generando dos posibles enantiómeros dependiendo de la cara por la que es atacado dicho ión. En la ciclación, por consiguiente, se genera un racémico.

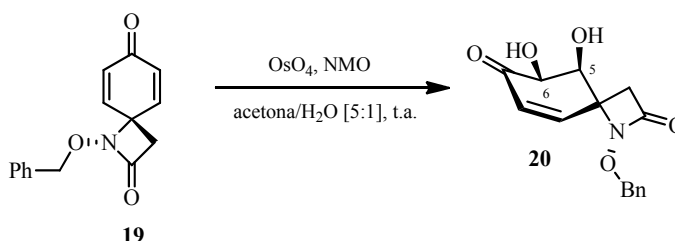
2.1.3. Preparación del 1,2-diol **20**

La preparación del 1,2-diol racémico **20** se realizó mediante la reacción de dihidroxilación de la β -lactama **19** catalizada por tetróxido de osmio²⁹ (6% de

²⁸ Propuesta mecanística formulada por Kikugawa y col. Ver: Ref. 26a.

²⁹ (a) Para una discusión general sobre la *cis*-dihidroxilación de alquenos con OsO_4 , ver: Schröder, M. *Chem. Rev.* **1980**, *80*, 187-213. (b) Sobre la dihidroxilación asimétrica de olefinas, ver: Sundermeier, U.; Döbler, C.; Beller, M. en *Modern Oxidation Methods*; Bäckvall, J-E. Ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2004, p. 1-20. Johnson, R.A.; Sharpless, K.B. en *Catalytic Asymmetric Synthesis*; Ojima, I. Ed.; VCH: New York, 1993; p. 227-272. Nicolau, K.C.; Sorensen, E.J. *Classics in Total Synthesis*; VCH: New York, 1996; p. 675-691. Noyori, R. *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 1994; p. 150-155. Zaitsev, A.B.;

OsO₄ disolución al 2.5% en peso en *t*-BuOH), utilizando el 4-óxido de 4-metilmorfolina^{30,31} como cooxidante estequiométrico, en una mezcla de acetona/agua [5:1] como disolvente (Esquema 2.1.3.1).³²



Esquema 2.1.3.1. Reacción de dihidroxilación de la β-lactama **19**.

La utilización de acetona como disolvente puede jugar un papel importante en el transcurso de la reacción, ya que cuando no se utiliza como disolvente, la reacción se ralentiza mucho o no tiene lugar. En este sentido, se propone la adición reversible del enol de la acetona al carbonilo de la β-lactama **19**, promovida por la 4-metilmorfolina que se genera en el medio de reacción, formando un alcohol alílico que activa sus dobles enlaces para la dihidroxilación.

Adolfsson, H. *Synthesis* **2006**, 1725-1756. Kolb, H.C.; VanNieuwenhze, M.S.; Sharpless, K.B. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2483-2547.

³⁰ Para la utilización de NMO como cooxidante estequiométrico en reacciones de dihidroxilación catalizadas con OsO₄ (conocido como proceso Upjohn), ver: (a) Eames, J.; Mitchell, H. J.; Nelson, A.; O'Brien, P.; Warren, S.; Wyatt, P. *J. Chem. Soc., P. T. 1* **1999**, 1095-1104. (b) Van Rheenen, V.; Kelly, R.C.; Cha, D.Y. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *23*, 1973-1976.

³¹ Proceso Upjohn. Ver: Van Rheenen, V.; Kelly, R.C.; Cha, D.Y. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *23*, 1973-1976.

³² a) La reacción se da por terminada en tres horas, a pesar de que queda algo de sustrato de partida sin reaccionar, ya que cuando se prolongó el tiempo de reacción se observó la desaparición del 1,2-diol **20** por TLC. Tras su posterior aislamiento y purificación se obtuvo el 1,2-diol racémico **20** como un sólido blanco con un rendimiento del 56% y un e.d. ≥ 98%. b) Otras condiciones de dihidroxilación que se ensayaron, variando el cooxidante, el número de equivalentes de éste o el disolvente, fueron: a) OsO₄ (6%) y NMO (1-4 equiv.) en acetona/agua [5:1]; b) OsO₄ (6%) y NMO (2.2 equiv.) en acetona/agua [5:1]; c) OsO₄ (2%), NMO (2 equiv.) y piridina (1 equiv.) en acetona/agua [3:1]; y d) OsO₄ (2%), NMO (1.2 equiv.) y PhB(OH)₂ g (1.2 equiv.) en CH₂Cl₂.

La asignación estructural del 1,2-diol **20** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.1.3.1).³³

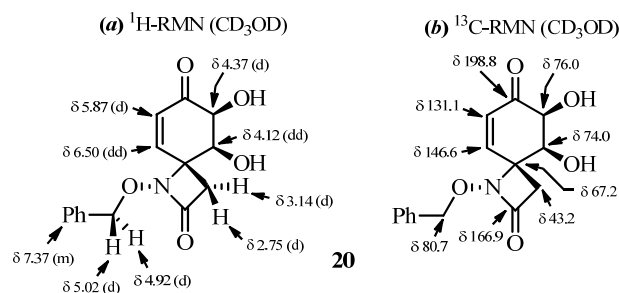


Figura 2.1.3.1. Selección de datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del 1,2-diol **20**.

En el espectro de ¹H-RMN, los protones del metileno bencílico, que en la β-lactama **19** aparecían como un singlete, se muestran como un sistema *AB* cuyas partes *A* y *B* se encuentran a 5.02 y 4.92 ppm ($J_{AB} = 11.2$ Hz). Por otra parte, los dobletes aparentes centrados a 3.14 y 2.75 ppm se asignaron al sistema *AB* ($J_{AB} = 14.4$ Hz) constituido por los protones metilénicos de la β-lactama (se propone que H-3 aparece más desapantallado que H-3' debido posiblemente a su proximidad al grupo hidroxilo de la posición C-5).

En el espectro ¹³C-RMN, además de los dos carbonos olefinicos a 131.1 ppm (C-8) y 146.6 ppm (C-9), se observan dos señales a 74.0 y 76.0 ppm que se asignan a los carbonos C-5 y C-6 respectivamente.

En el espectro IR, aparece una banda ancha e intensa a 3429 cm⁻¹ atribuida a la tensión O-H de los hidroxilos.

³³ La asignación de las señales de RMN del 1,2-diol **20** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y NOESY. Los espectros se realizaron empleando CD₃OD como disolvente debido a la baja solubilidad del 1,2-diol **20** en CDCl₃.

La estereoquímica relativa de los centros C-5 y C-6, junto a la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexenona en disolución, se determinaron mediante el análisis de las constantes de acoplamiento y experimentos NOE (Figura 2.1.3.2).

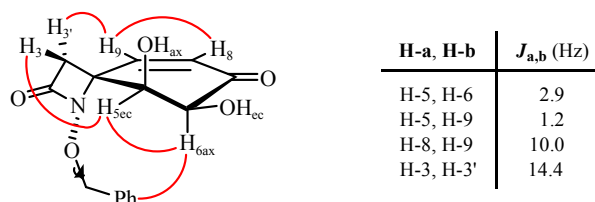


Figura 2.1.3.2. Relación de constantes de acoplamiento y NOEs (en color rojo) más significativos del 1,2-diol **20**.

El protón H-5, además de tener una constante de acoplamiento tipo *gauche* (2.9 Hz) con H-6, presenta una constante de acoplamiento a larga distancia con el protón H-9 ($J_w = 1.2$ Hz), lo cual implica que se encuentra en una posición ecuatorial. Por otra parte, el NOE que presenta el protón H-3 de la β -lactama con H-5 (no observado para H-6), así como la existencia de NOEs entre los protones aromáticos del fenilo y los del ciclohexeno (especialmente con H-6 y, en menor medida, con H-5), indican la orientación axial de H-6 por la cara β de la molécula (Figura 2.1.3.2).

De estos datos espectroscópicos se deduce que la ciclohexenona presenta una conformación mayoritaria tipo semisilla 5H_6 en la que los grupos hidroxilos sobre los carbonos C-5 y C-6, se encuentran en disposición axial y ecuatorial, respectivamente, ambos en *anti* con respecto al nitrógeno.

Proponemos que la conformación mayoritaria del 1,2-diol **20** en disolución es aquella en la que el sustituyente bencilo se encuentra ocupando la cara β del anillo de ciclohexenona. Esta conformación está estabilizada por la

presencia de una interacción C-H... π aromático³⁴ entre el enlace C(6)-H(6) y el fenilo (Figura 2.1.3.3).³⁵ El hecho de que los protones del metileno bencílico aparezcan como un sistema *AB* ($\Delta\delta_{AB} = 0.10$ ppm)³⁶ en el espectro de ¹H-RMN, que sugiere la presencia de un rotámero predominante, apoyaría dicha propuesta.

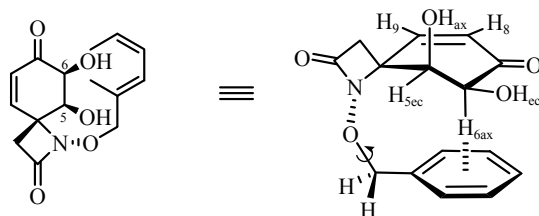


Figura 2.1.3.3. Interacción C-H... π aromático propuesta para el 1,2-diol **20**.

La existencia de una interacción π - π intramolecular entre la ciclohexadienona y el anillo aromático del sustituyente bencilo, presumiblemente favorecerá que la reacción de dihidroxilación transcurra de forma diastereoselectiva por la cara α de la molécula, menos impedida estéricamente y *anti* al nitrógeno alílico que activa el doble enlace. El grupo benciloxi de la β -lactama **19**, permanece el tiempo suficiente por la cara β como para impedir la aproximación del oxidante por esta cara.

³⁴ Para algunos estudios sobre las interacciones C-H... π , ver: (a) Nishio, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6923-6950. (b) Nishio, M.; Umezawa, Y.; Hirota, M.; Takeuchi, Y. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8665-8701. (c) Nishio, M.; Hirota, M. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7201-7245. (d) Meyer, E.A.; Castellano, R.K.; Diederich, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210-1250. (e) Muraki, M. *Protein Peptide Lett.* **2002**, *9*, 195-209. (f) Bogdanovic, G.A.; Medakovic, V.; Milcic, M.K.; Zaric, S.D. *Int. J. Mol. Sci.* **2004**, *5*, 174-185. (g) Tóth, G.; Murphy, R.F.; Lovas, S. *Protein Engineering* **2001**, *14*, 543-547.

³⁵ En el espectro ¹H-RMN, el desapantallamiento esperable para H-6 debido a su orientación axial se ve disminuido por el efecto apantallante del anillo aromático.

³⁶ De ahora en adelante, para los protones que constituyan un sistema *AB* se representará con $\Delta\delta_{AB}$ la diferencia de desplazamiento químico de ¹H-RMN entre las correspondientes partes *A* y *B* del sistema (asignando la letra *A* al núcleo que resuena a campo más bajo). Los valores de $\Delta\delta_{AB}$ se calcularán según el siguiente criterio: $\Delta\delta_{AB} = \delta_A - \delta_B$.

Además, proponemos que las interacciones entre el par de electrones del N con el H del bencilo son desestabilizantes, mientras que las interacciones π - π intramolecular entre la ciclohexadienona y el anillo aromático del sustituyente bencilo son estabilizantes. Por ello, la presencia del grupo bencilo por la cara β e interaccionando con el doble enlace más rico en electrones, favorece la dihidroxilación del doble enlace más deficiente en electrones por la cara α .

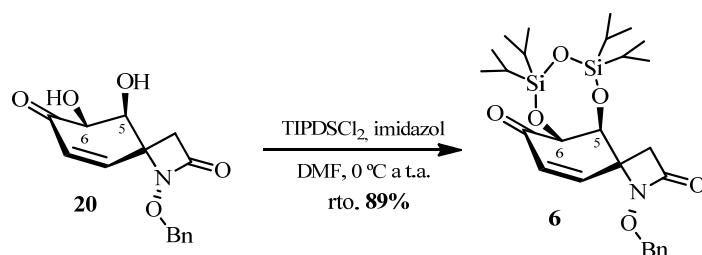
El moderado rendimiento en la dihidroxilación de la β -lactama **19** puede deberse a un proceso de β -eliminación del hidroxilo (C(5)-OH). Este proceso estaría favorecido por la disposición *anti* que presenta el C(5)-OH con respecto al protón ácido H-6, en α al carbonilo, en la conformación 5H_6 de su anillo de ciclohexanona.

2.1.4. Protección del diol **20** con el grupo bifuncional TIPDS³⁷

La reacción del 1,2-diol **20**, TIPDSCl₂ e imidazol en DMF, después de 18 horas a temperatura ambiente y tras purificación del crudo de reacción en columna,³⁸ dió lugar a la ciclohexenona **6** como un sólido blanco con un rendimiento de 89%. (Esquema 2.1.4.1).

³⁷ El grupo TIPDS es un grupo protector basado en silicio bifuncional, voluminoso y bastante estable frente a medios ácidos y básicos, que es utilizado para proteger 1,2- y 1,3-dioles. (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 2007; p.p. 356-360. (b) Para el primer ejemplo de protección de dioles con TIPDSCl₂, ver: Markiewicz, W.T. *J. Chem. Res. Synop.* **1979**, 24-25. (c) Como ejemplo de protección simultánea de dos hidroxilos secundarios con el grupo TIPDS, ver: Schaumberg, J. P.; Hokanson, G. C.; French, J. C. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1651-1656; Verdegaa, C.H.M.; Jansse, P.L.; De Rooij, J.F.M.; Van Boom, J.H. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 1571-1574.

³⁸ El ciclohexenona **6** se aísla siguiendo el procedimiento habitualmente empleado para este tipo de reacciones de sililación: Tras tratar la mezcla de reacción con agua y extraerla con AcOEt; la fase orgánica se lava sucesivamente con CuSO₄ sat. y NaCl sat.



Esquema 2.1.4.1. Protección del diol **20** como su TIPDS-derivado **6**.

La asignación estructural de la ciclohexenona **6** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.1.4.1).³⁹

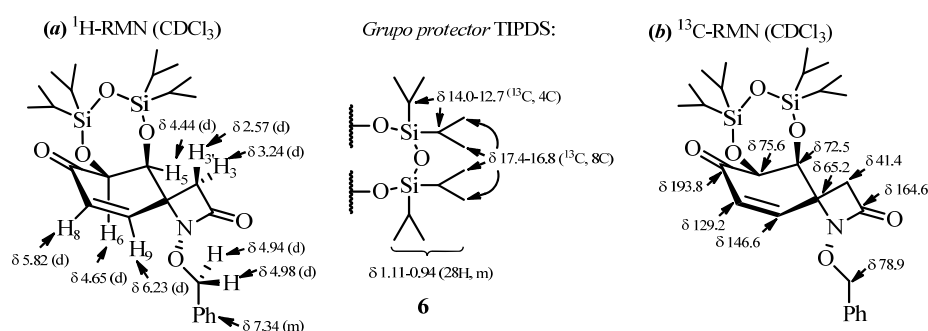


Figura 2.1.4.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la ciclohexenona **6**

(se destacan las señales de RMN características del grupo protector TIPDS).

En el espectro de ^1H -RMN, el multiplete que integra para 28 protones localizado en el intervalo comprendido entre 1.11 y 0.94 ppm se asignó a los cuatro isopropilos del grupo TIPDS. Las señales que aparecen como dos dobletes aparentes centrados a 6.23 y 5.82 ppm, se asignaron al sistema AB ($J_{AB} = 10.2$ Hz) formado por sus correspondientes protones olefínicos H-9 y H-8. Los dobletes situados a 4.65 y 4.44 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 2.9 Hz,

³⁹ La asignación de las señales de RMN de la ciclohexenona **6** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

se asignaron a los protones H-6 y H-5, respectivamente. Los protones bencílicos se muestran como un sistema *AB*, casi degenerado, a 4.98 y 4.94 ppm ($J_{AB} = 11.5$ Hz). Por último, los dobletes aparentes centrados a 3.24 y 2.57 ppm se asignaron al sistema *AB* ($J_{AB} = 14.2$ Hz) constituido por los respectivos protones metilénicos de la β -lactama, H-3 y H-3'.

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observan las señales correspondientes al grupo TIPDS. Los ocho metilos de los isopropilos aparecen como siete señales a 17.4, 17.3, 17.15, 17.1, 17.0, 16.95 y 16.8 ppm, mientras que los cuatro carbonos CH unidos directamente al silicio se encuentran a 14.0, 13.4, 12.9 y 12.7 ppm.⁴⁰ Además, se conservan las señales características de los carbonos de la estructura de ciclohexenona-espiro- β -lactama, apareciendo C-9 a 146.6 ppm, C-8 a 129.2 ppm, C-6 a 75.6 ppm y C-5 a 72.5 ppm.

En el espectro IR, aparecen bandas originadas por el grupo protector basado en silicio: a 1102 y 998 cm^{-1} , las de vibración de tensión Si-O-C; a 1060 cm^{-1} , la de tensión Si-O-Si; y a 816 cm^{-1} , la de tensión Si-C. Además, se observan las bandas de tensión C=O de la enona a 1694 cm^{-1} y la de tensión N-C=O de la β -lactama a 1781 cm^{-1} .

El anillo de seis miembros de la ciclohexenona **6** presenta una conformación mayoritaria en disolución tipo semisilla 5H_6 , deducible de la existencia del NOE entre el protón H-3 de la β -lactama y H-5_{ec} (Figura 2.1.4.2). Se observa un NOE entre H-3 y los protones del grupo protector. Por otra parte, en el espectro de HMBC se observan correlaciones a tres enlaces de poca intensidad entre el protón ecuatorial H-5 y los carbonos C-7 y C-9. Teniendo en cuenta las orientaciones axial y ecuatorial de los oxígenos de sus respectivas

⁴⁰ Las señales de ^1H - y ^{13}C -RMN asignadas al grupo protector TIPDS aparecieron en los espectros de RMN de todos aquellos productos que contienen dicho grupo, por lo que ya no serán mencionadas en adelante.

posiciones C-5 y C-6, se propone que la conformación mayoritaria del anillo de trioxadisilepano formado por el grupo TIPDS es la de un bote $^{O(6),Si-O(5)}B$.

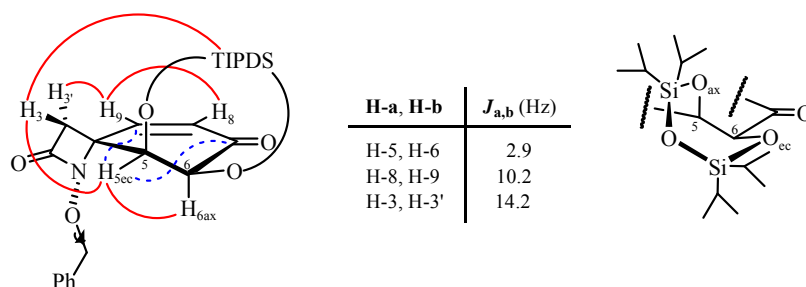


Figura 2.1.4.2. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del ciclohexenona **6**.

El anillo de trioxadisilepano formado por el grupo TIPDS presenta dos conformaciones extremas: Una es la de un bote $^{O(5),Si-O(6)}B$ y la otra un bote $^{O(6),Si-O(5)}B$, dependiendo de la disposición que ocupen los oxígenos de las posiciones 5 y 6. (Figura 2.1.4.3).

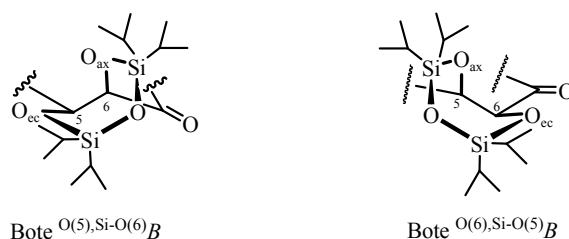
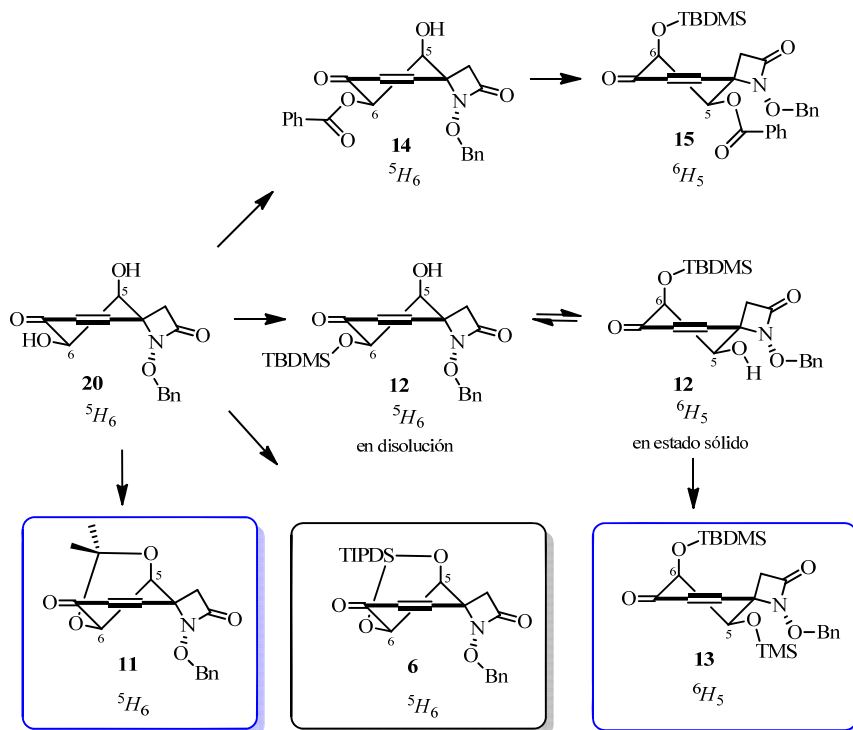


Figura 2.1.4.3. Conformaciones del anillo de trioxadisilepano formado por el grupo TIPDS

Los dioles protegidos con grupos cíclicos como la ciclohexenona **6** y el acetal **11**⁴¹, presentan una conformación mayoritaria en disolución para el anillo

⁴¹ Ver *Parte Experimental* de la presente Tesis Doctoral.

de ciclohexanona tipo semisilla 5H_6 ,⁴² mientras que los dioles protegidos con dos grupos protectores diferentes como el bisiléter **13**⁴³ es mayoritariamente una semisilla 6H_5 . (Esquema 2.1.4.2)



Esquema 2.1.4.2. Análisis conformacional del anillo de ciclohexenona en procesos de protección (por acilación o por sililación) del 1,2-diol **20**.

La barrera conformacional para interconvertir las dos semisillas de la ciclohexenona **6** y el acetal **11** (6H_5 y 5H_6) sería significativamente mayor cuando esta se encuentra 1,2-*cis*-fusionada con un anillo de siete miembros que en el caso

⁴² El anillo de 1,3-dioxolano del acetal **11** presenta una conformación mayoritaria en disolución tipo sobre E_5 . Por su parte, el anillo de trioxadisilepeno de la ciclohexenona **6** presenta una conformación mayoritaria tipo bote ${}^{O(6),Si-O(5)}B$.

⁴³ Ver *Parte Experimental* de la presente Memoria.

de estarlo con uno de cinco miembros en el que la semisilla estará ligeramente aplanada y los ángulos diédricos (O-C(6)-C(5)-O) serían más pequeños.

El cambio conformacional (en disolución), que experimenta el anillo de ciclohexenona, tiene lugar en el proceso de protección del hidroxilo C(5)-OH del alcohol **12**,⁴⁴ que pasa de ser una semisilla 5H_6 a ser mayoritariamente 6H_5 para el anillo de ciclohexenona en el bisililéter **13** (Esquema 2.1.4.2).

Se propone que la protección de los dos hidroxilos del 1,2-diol **20** con el grupo protector bifuncional reacciona inicialmente con el hidroxilo ecuatorial en C-6,⁴⁵ por ser este más reactivo que el hidroxilo axial en C-5. Una vez fijado en esta posición, reacciona intramolecularmente con el hidroxilo de C-5 generando un ciclo que limita la movilidad conformacional de la molécula. Cuando se utiliza como grupo protector el 2,2-dimetoxipropano, se genera un ciclo de cinco miembros de tipo 1,3-dioxolano,⁴⁶ lo que produce un aplanamiento de la semisilla del ciclohexano debido a la tensión torsional. Esto puede potenciar la acidez del protón H-6 y aumentar la inestabilidad de la β -hidroxicetona protegida. Cuando se utiliza como grupo protector el TIPDSCl₂, se genera un ciclo de siete miembros de tipo 1,3,5-trioxa-2,4-disilepano que reduce la tensión del anillo (tanto angular, tensión de Baeyer, como torsional),⁴⁷ aumentando su estabilidad y permitiendo que los sustituyentes oxigenados de sus posiciones C-5 y C-6 acentúen sus respectivas orientaciones axial y ecuatorial y que los protones H-5 y H-6 adopten una conformación *gauche* limitándose así la movilidad conformacional de la

⁴⁴ El alcohol **12** en estado sólido presenta una conformación 6H_5 , mientras que en disolución presenta una conformación 5H_6 . Sobre la conformación en estado sólido de este compuesto ver el *Anexo A* de Rayos X de la presente Memoria.

⁴⁵ Al realizar monoprotecciones, acilación (ver *Parte Experimental* compuesto **14**) o sililación (ver *Parte Experimental* alcohol **12**), se protege regioselectivamente el hidroxilo ecuatorial sobre C-6 del 1,2-diol **20**.

⁴⁶ Ver la preparación del dimetilacetal **11** en la parte experimental.

⁴⁷ (a) Eliel, E.L.; Wilen, S.H. *Stereochemistry of Organic Compounds*; Wiley-Interscience: New York, 1994; p. 675-678. (b) Wiberg, K.B. *Angew. Chem. Int. Engl.* **1986**, *25*, 312-322. (c) Baeyer, A. *Chem. Ber.* **1885**, *18*, 2269-2281.

molécula y aportando mayor rigidez conformacional al anillo de ciclohexenona con el que está fusionado.

Si la protección del 1,2-diol **20** se lleva a cabo con dos grupos protectores distintos, inicialmente se produce una protección regioselectiva del hidroxilo ecuatorial en C-6 (acilación⁴⁸ o sililación⁴⁹) y posteriormente, una protección del hidroxilo en la posición C-5 (acilación⁵⁰ o sililación⁵¹) con un grupo protector diferente al empleado en C-6, obteniéndose compuestos diprottegidos con una gran movilidad conformacional y menor rigidez conformacional del anillo de ciclohexenona.

La ciclohexenona **6** será utilizada como producto de partida tanto por su estabilidad química, como por contener en su estructura ocho (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9 y C-10) de los once carbonos presentes en *rac*-**1**, el futuro nitrógeno N-1, las posiciones oxigenadas C-7 y C-8 con una disposición estereoquímica *anti* respecto al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en la *rac*-TTX. La ciclohexenona **6** se prepara con un rendimiento global de 40% en cinco etapas a partir del clorhidrato de *O*-bencilhidroxilamina y cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo, productos comerciales y baratos.

A partir de ella, en la presente Memoria se seguirán dos rutas sintéticas diferentes: a) **Ruta A:** con la incorporación temprana del futuro carbono C-11 de la tetrodotoxina e incorporación tardía de C-4 y b) **Ruta B:** con la incorporación temprana del futuro carbono C-4 de la tetrodotoxina y posterior incorporación de C-11.

⁴⁸ Ver *Parte Experimental*: Preparación de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*)-1-benciloxi-6-benzoiloxi-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**14**) p. 21.

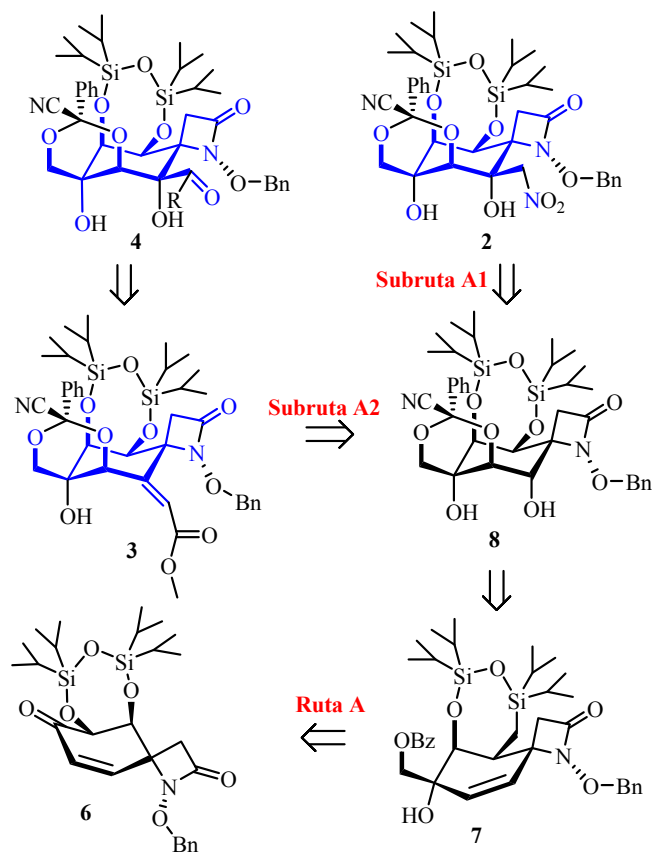
⁴⁹ Ver *Parte Experimental*: Preparación de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*)-1-benciloxi-6-(*tert*-butildimetilsililoxi)-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) p. 16.

⁵⁰ Ver *Parte Experimental*: Preparación de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*)-1-benciloxi-6-benzoiloxi-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**14**) p. 21.

⁵¹ Ver *Parte Experimental*: Preparación de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*)-1-benciloxi-6-(*tert*-butildimetilsililoxi)-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) p. 16.

2.2. Ruta A: Preparación de los análogos de Tetrodotoxina, nitroalcohol 2, alqueniléster 3 y cetoéster 4

Uno de los objetivos prácticos sintéticos de la Memoria consiste en la síntesis total de los compuestos **2**, **3** y **4** como análogos del *core* de la tetrodotoxina. Para ello, se desarrollará la Ruta A de acuerdo al esquema retrosintético mostrado en el Esquema 2.2.1.

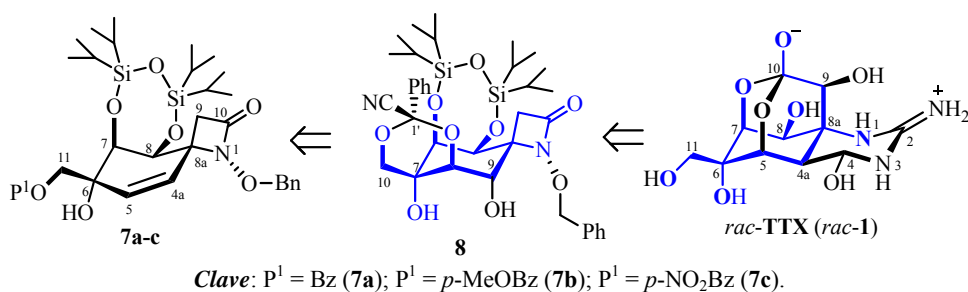


Clave: R = CO₂Me.

Esquema 2.2.1. Esquema retrosintético de *rac*-TTX (*rac*-1) para la Ruta A.
(se resalta en color azul el *core* de TTX).

2.2.1. Preparación del cianobenciliden acetal 8

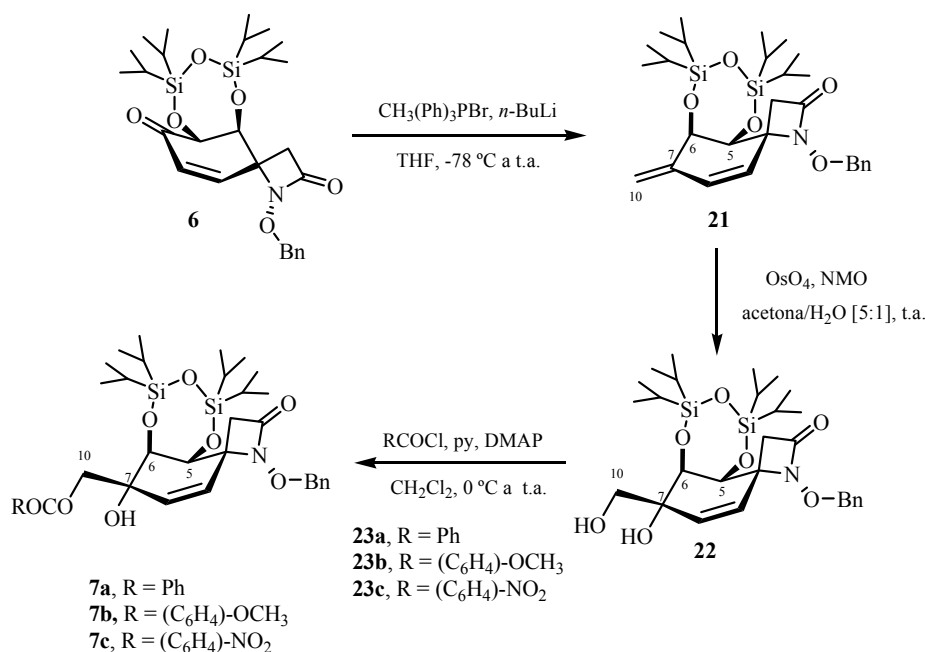
De acuerdo con el Esquema 2.2.1.1, los benzoatos **7a-c** serán los primeros intermedios a sintetizar. Estos compuestos presentan en su esqueleto nueve (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos presentes en *rac*-**1**, el futuro nitrógeno N-1, los grupos hidroxilo e hidroximetilo en C-6 con la estereoquímica adecuada y las posiciones oxigenadas C-7 y C-8 con una disposición estereoquímica *anti* respecto al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en la *rac*-TTX.⁵² Además, poseen la funcionalidad adecuada para la incorporación tanto del oxígeno de la posición C-5 como de los carbonos C-2 y C-4 que se encuentran en *rac*-TTX (*rac*-**1**).



Esquema 2.2.1.1. Esquema retrosintético de los benzoatos, **7a-c**, y su relación estructural con *rac*-TTX (*rac*-**1**) (en color azul se muestra su esqueleto común).

En la presente Memoria, los benzoatos **7a-c** se prepararán a partir de la ciclohexenona **6** en tres etapas: 1) Incorporación del carbono C-11 de *rac*-TTX (*rac*-**1**) mediante reacción de Wittig; 2) Incorporación de la funcionalidad oxigenada, con la estereoquímica adecuada en las posiciones C-6 y C-11; 3) Protección selectiva del hidroxilo primario (Esquema 2.2.1.2).

⁵² El puente carbonado C(9)-C(10) de *rac*-TTX (*rac*-**1**) y su nitrógeno de la posición N-1 se encuentran enmascarados como una β -lactama.

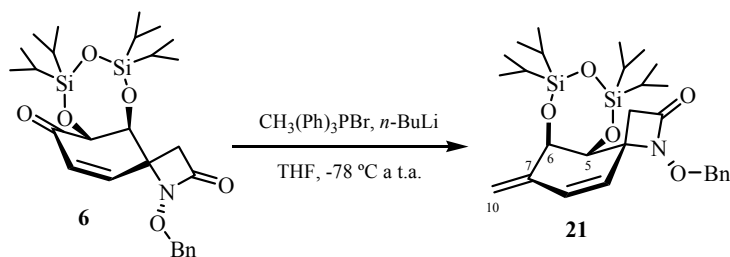


Esquema 2.2.1.2. Esquema sintético de la preparación de los benzoatos **7a-c**.

2.2.1.1. Preparación del dieno **21**

La reacción de Wittig⁵³ de la ciclohexenona **6** con metiluro de trifenilfosfonio, generado *in situ* por desprotonación de la sal de fosfonio comercial, condujo a la formación del dieno **21**, que incorpora el futuro carbono C-11 de *rac*-TTX (Esquema 2.2.1.1.1).

⁵³ (a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chem. Ber.* **1954**, *87*, 1318-1330. (b) Sobre la síntesis de alquenos utilizando iluros de fósforo, ver: Kelly, S.E. en *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B.M.; Fleming, I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; vol. 1, p. 755-782. (c) Para algunas revisiones bibliográficas sobre la reacción de Wittig, ver: (a) Edmonds, M; Abell, A. *Modern carbonyl olefination*; Takeda, T., Ed: Wiley-VCH: Weinheim, Germany **2004**, Capítulo 1. (b) Vedejs, E.; Peterson, M.J. *Top. Stereochem.* **1994**, *21*, 1-157. Maryanoff, B.E.; Reitz, A.B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927. Bestmann, H.J.; Vostrowsky, O. *Top. Curr. Chem.* **1983**, *109*, 85-164. (c) Como ejemplo de una reacción de Wittig de una cetona cíclica con un iluro de fósforo, ver: (a) Nango, E.; Eguchi, T.; Kakinuma, K. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 593-600; (b) Barton, D. H. R.; Bath, S.; Billington, D. C.; Gero, S. D.; Quiclet-Sire, B.; Samadi, M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 1551-1558.



Esquema 2.2.1.1.1. Reacción de Wittig de la ciclohexenona **6**.

La preparación del correspondiente fosforano consistió en la adición de $n\text{-BuLi}$, a -78°C y bajo atmósfera de argón, sobre una suspensión de bromuro de trifenilfosfonio en THF. Sobre la disolución amarilla de iluro resultante, se añadió, lentamente a -78°C , la ciclohexenona **6** disuelta en THF. Después de 2 horas a temperatura ambiente, y tras su posterior aislamiento y purificación se obtuvo el dieno **21** con un rendimiento del 68% (Esquema 2.2.1.1.1).

El rendimiento del dieno depende de la pureza de la sal de fosfonio comercial utilizada⁵⁴ y del número de equivalentes de iluro formado. Los mejores resultados se obtuvieron al emplear 1.05 equivalentes de fosforano, a pesar de que la conversión no sea total y se recupere un 9% de la ciclohexenona de partida **6**.

En estas condiciones, además del dieno **21**, se aisló la acrilamida **24**, producto secundario que deriva de la apertura del anillo de β -lactama (Figura 2.2.1.1.1).

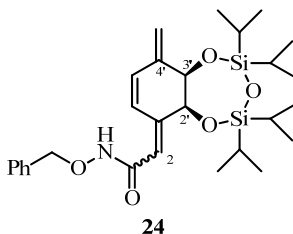
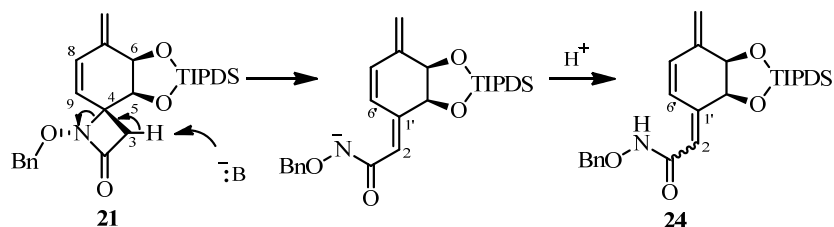


Figura 2.2.1.1.1. Producto secundario de la reacción de Wittig de la ciclohexenona **6**.

⁵⁴ Se seca la sal de fosfonio en un desecador, conectado a vacío y provisto de pentóxido de fósforo como agente desecante durante 24 horas.

La propuesta mecanística para la formación de la acrilamida **24** a partir del dieno **21** consiste en que en el medio básico de reacción, la apertura de la β -lactama se facilita por la eliminación de uno de sus protones metilénicos ácidos y salida del nitrógeno en C-4 con la formación del correspondiente doble enlace (Esquema 2.2.1.1.2).



Esquema 2.2.1.1.2. Propuesta mecanística para la formación de la acrilamida **24**.

La asignación estructural del dieno **21** se realizó en base a sus datos espectroscópicos. (Figura 2.2.1.1.2).⁵⁵

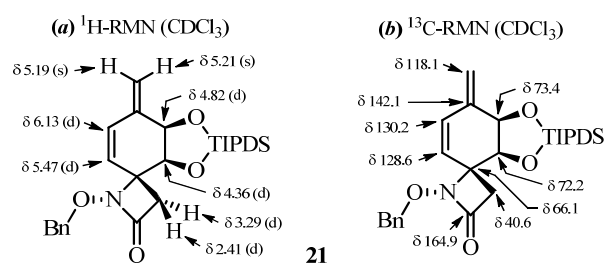


Figura 2.2.1.1.2. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del dieno **21**.

En el espectro de ^1H -RMN, los protones del doble enlace exocíclico aparecen como dos singletes a 5.21 ppm (H-10) y 5.19 ppm (H-10'). Los dobletes

⁵⁵ La asignación de las señales de RMN del dieno **21** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: HSQC, HMBC y NOESY.

situados a 6.13 y 5.47 ppm se asignaron al sistema AB ($J_{AB} = 10.0$ Hz) constituido por los protones del doble enlace endocíclico H-8 y H-9, respectivamente. El protón alílico H-6 aparece como un doblete especialmente desapantallado a 4.82 ppm ($J = 2.9$ Hz), mientras que H-5 se muestra como otro doblete a 4.36 ppm ($J = 2.9$ Hz).

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observan las señales de los cuatro carbonos olefínicos del sistema diénico localizadas a 142.1 ppm (C-7), 130.2 ppm (C-8), 128.6 ppm (C-9) y 118.1 ppm (C-10).

En el espectro de IR, la banda de tensión N-C=O de β -lactama se mantiene a 1780 cm^{-1} y se aprecian dos bandas débiles, a 1644 y 1602 cm^{-1} , atribuidas a la vibración de tensión de los enlaces C=C.

Por último, el espectro de masas $LRMS$ ($API\text{-}ES^+$) presenta los picos m/z 530 ($M+H$) $^+$, 552 ($M+Na$) $^+$ y 1081 ($2M+Na$) $^+$.

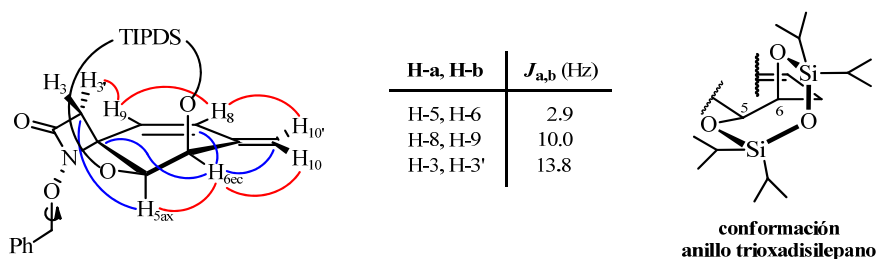


Figura 2.2.1.1.3. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul), NOEs (en color rojo) más significativos del dieno **21** y conformación del anillo de trioxadisilepano.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexeno del dieno **21** es una semisilla 6H_5 deducible de la existencia de un acoplamiento a larga distancia entre el protón olefínico H-8 y H-6ec (observado en COSY), y del NOE que presenta éste último con el protón H-10 del doble enlace exocíclico. Además, las correlaciones a tres enlaces observadas en HMBC para el protón ecuatorial H-6

con los carbonos C-4, C-8 y C-10 y para el protón axial H-5 con el metileno pseudoaxial C-3 de la β -lactama, estarían de acuerdo con esta asignación. (Figura 2.2.1.1.3).⁵⁶

Teniendo en cuenta las orientaciones ecuatorial y axial de los oxígenos de sus respectivas posiciones C-5 y C-6, se propone que la conformación mayoritaria para el anillo de trioxadisilepano que conforma el grupo protector TIPDS es un bote $^{O(5),Si-O(6)}B$. (Figura 2.2.1.1.3).

Durante la reacción de Wittig, se experimenta un cambio conformacional al pasar de la ciclohexenona **6** al dieno **21**.⁵⁷ La semisilla 5H_6 presente en la ciclohexenona de partida **6**, pasa a ser mayoritariamente una semisilla 6H_5 en el dieno **21**, donde el grupo oxigenado alílico de C-6 ocupa una posición axial^{58,59} (Esquema 2.2.1.1.3).

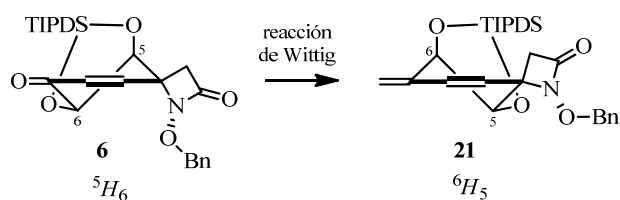
⁵⁶ En el dieno **21**, la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexeno es una semisilla 6H_5 y la conformación mayoritaria para el anillo de trioxadisilepano es un bote $^{O(5),Si-O(6)}B$.

⁵⁷ Este cambio conformacional también se observa en la formación del correspondiente dieno del bisililéter **13**.

⁵⁸ Por lo general, los alcoholes alílicos tienden a presentar una conformación mayoritaria en la que el hidroxilo se dispone perpendicular al plano que contiene el doble enlace. Esta conformación estaría favorecida por dos motivos: (a) se minimizan las tensiones alílicas [ver: Hoffmann, R.W. *Chem. Rev.* **1989**, 89, 1841-1860]; y (b) presenta una interacción estabilizante por solapamiento entre el orbital antienlazante vacío del enlace C-O (σ^*_{C-O}) y el HOMO del alqueno ($\pi_{C=C}$) [ver: Houk, K.N.; Paddon-Row, M.N.; Rondan, N.G.; Wu, Y.D.; Brown, F.K.; Spellmeyer, D.C.; Metz, J.T.; Li, Y.; Loncharich, R.J. *Science* **1986**, 231, 1108-1117]:

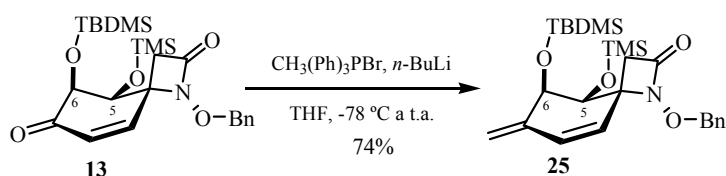


⁵⁹ Sobre el análisis conformacional de alcoholes alílicos y otros sistemas relacionados, ver: (a) Gung, B.W.; Melnick, J.P.; Wolf, M.A.; King, A. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 1947-1951. (b) Kahn, S.D.; Hehre, W.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 666-671. (c) Kahn, S.D.; Pau, C.F.; Chamberlin, A.R.; Hehre, W.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 650-663. (d) Chamberlin, A.R.; Mulholland, R.L.; Kahn, S.D.; Hehre, W.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 672-677. (e) Houk, K.N.; Duh, H-Y.; Wu, Y-D.; Moses, S.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2754-2755. (f) Kahn, S.D.; Hehre, W.J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 3647-3650. (g) Paddon-Row, M.N.; Rondan, N.G.; Houk,



Esquema 2.2.1.1.3. Cambio conformacional en la reacción de Wittig de la ciclohexenona **6**.

Por su parte la reacción de Wittig sobre el bisililéter **13** usando el mismo procedimiento experimental conduce al correspondiente bisilildieno **25**⁶⁰ (74%) como un aceite incoloro. (Esquema 2.2.1.1.4).



Esquema 2.2.1.1.4. Reacción de Wittig de la bisililéter **13**.

Durante este proceso, no se observa un cambio en la preferencia conformacional para el anillo de ciclohexeno manteniendo la conformación ⁶H₅.

Como productos secundarios de la reacción se obtiene la acrilamida **26** (2%), equivalente a la acrilamida **24**, y además, se obtienen la γ -lactama **27** (4%) y el acrilato **28** (2%) (Figura 2.2.1.1.4).⁶¹

K.N. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7162-7166. (h) Para una discusión general sobre tensiones alílicas en anillos de seis miembros, ver: Johnson, F. *Chem. Rev.* **1968**, *68*, 357-413.

⁶⁰ El dieno conjugado **25** presenta una conformación mayoritaria ⁶H₅ igual que el equivalente sintético **21**.

⁶¹ Ver el procedimiento y los productos secundarios **26**, **27** y **28** en la parte experimental.

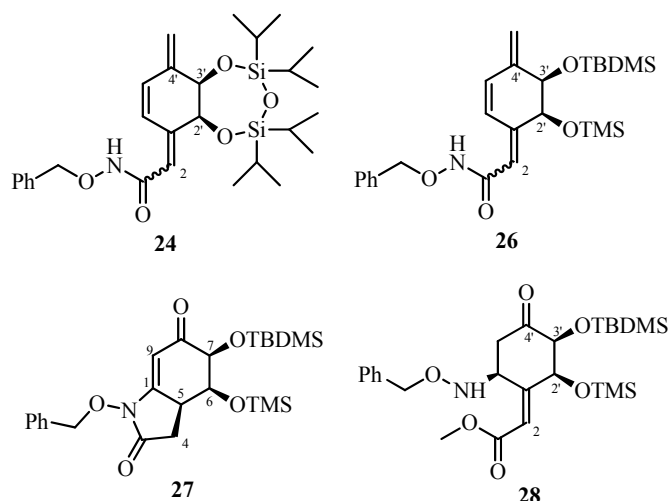
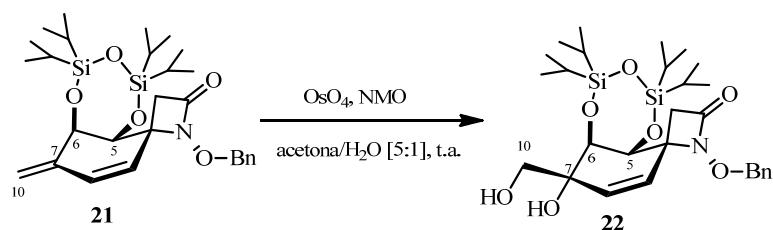


Figura 2.2.1.1.4. Estructuras químicas de los productos secundarios de la reacción de Wittig de la ciclohexenona **6** y del bisililéter **13**.

2.2.1.2. Preparación del diol **22**

Una vez incorporado el carbono C-11 de la *rac*-TTX, el objetivo era incorporar la funcionalidad oxigenada, con la estereoquímica adecuada, en las posiciones C-6 y C-11. Para ello, se llevó a cabo un proceso de la oxidación estereocontrolada y regioselectiva del doble enlace exocíclico $\Delta^{7(10)}$ (activado por el oxígeno alílico) por la cara β del dieno **21**.

La reacción del dieno **21** con tetróxido de osmio (como catalizador) y NMO (como cooxidante estequiométrico) en una mezcla acetona/agua [5:1] condujo, después de 16 horas a temperatura ambiente y tras purificación cromatográfica, al diol **22** con un rendimiento del 88%. (Esquema 2.2.1.1.2.1).



Esquema 2.2.1.2.1. Dihidroxilación regio y diastereoselectiva del dieno **21**.

La asignación estructural del diol **22** se realizó en base a sus datos espectroscópicos. (Figura 2.2.1.2.1).

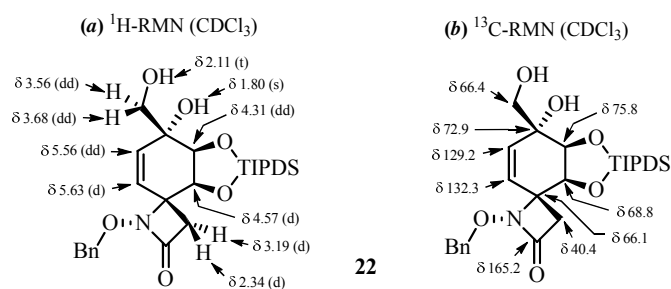


Figura 2.2.1.2.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del diol **22**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que aparecen como dos dobletes de dobletes centrados a 3.68 y 3.56 ppm, ambos con unas constantes de acoplamiento de 11.1 y 5.8 Hz, se asignaron a los correspondientes protones H-10 y H-10' del resto hidroximetilo. El triplete ($J = 5.8$ Hz) observado a 2.11 ppm, se asignó al acoplamiento del hidroxilo primario con los protones H-10 y H-10'. El singlete situado a 1.80 ppm se asignó al grupo hidroxilo terciario introducido en

C-7.⁶² También, se observan las señales pertenecientes a los protones del anillo de ciclohexeno: un doblete ($J = 10.1$ Hz) situado a 5.63 ppm se asignó a H-9, un doblete de dobletes ($J = 10.1$ y 1.1 Hz) situado a 5.56 ppm se asignó a H-8, un doblete ($J = 2.6$ Hz) situado a 4.57 ppm se asignó a H-5; un doblete de dobletes ($J = 2.6$ y 1.1 Hz) situado a 4.31 ppm se asignó a H-6.

En el espectro de ^{13}C -RMN, aparecen dos señales a 72.9 y 66.4 ppm, que fueron asignadas a los carbonos unidos a oxígeno del diol, C-7 (cuaternario) y C-10 (metilénico), respectivamente.

En el espectro de IR, la banda ancha e intensa que presenta a 3428 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión de los enlaces O-H del diol y a 1761 cm^{-1} aparece la banda de tensión N-C=O de β -lactama. Se observa una disminución de frecuencia de la vibración de tensión del enlace C=O β -lactámico del diol **22** con respecto al dieno de partida, $\Delta\nu_{\text{C=O}}(\mathbf{22-21}) = -19\text{ cm}^{-1}$,⁶³ atribuible a su posible participación en enlaces de hidrógeno intermoleculares.

Por último, en el espectro de masas *LRMS* (*API-ES*⁺) se aprecian los picos m/z apropiados: 564 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 586 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ y 1149 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺.

La conformación mayoritaria en disolución del diol **22**, junto a la configuración relativa de su centro estereogénico C-7, fueron determinadas mediante el análisis sus constantes de acoplamiento y por experimentos NOESY (Figura 2.2.1.2.2).

⁶² Dependiendo de la concentración de la muestra y de la cantidad de agua que contenga el CDCl_3 empleado como disolvente, se observa una variación en la multiplicidad de las señales de ^1H -RMN atribuidas al sustituyente hidroximetilo de C-7. En algunas ocasiones, se pierde la constante de acoplamiento (5.8 Hz) que presentan los protones del metileno C-10 con el hidroxilo primario. En estos casos, H-10 (3.68 ppm) y H-10' (3.56 ppm) constituyen un sistema *AB* ($J_{\text{AB}} = 11.1$ Hz) y los dos hidroxilos del diol aparecen como un único singlete a 2.19 ppm.

⁶³ El valor de $\Delta\nu_{\text{C=O}}$ se calcula según el siguiente criterio: $\Delta\nu_{\text{C=O}}(\mathbf{x-y}) = \nu_{\text{C=O}}(\mathbf{x}) - \nu_{\text{C=O}}(\mathbf{y})$.

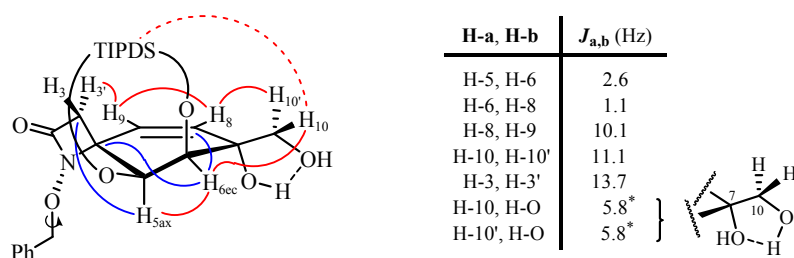


Figura 2.2.1.2.2. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del diol **22** (las constantes de acoplamiento señaladas con un asterisco no siempre se observan).

La conformación del anillo de ciclohexeno es la de una semisilla 6H_5 (Figura 2.2.1.1.2.2), deducible de la existencia de una constante de acoplamiento a larga distancia entre el protón olefínico H-8 y H-6ec ($J_w = 1.1$ Hz). Además, las correlaciones a tres enlaces observadas en HMBC para el protón ecuatorial H-6 con los carbonos C-4 y C-8 y para el protón axial H-5 con el metileno pseudoaxial C-3 de la β -lactama estarían de acuerdo con esta asignación.⁶⁴

El protón H-10' (3.56 ppm) posee un NOE con H-8, mientras que el protón H-10 (3.68 ppm) da lugar a NOEs con H-6ec y con alguno de los isopropilos del grupo protector TIPDS (aunque de poca intensidad). Por su parte, el protón H-5ax no presenta NOEs, ni con el protón H-3 (3.19 ppm) de la β -lactama, ni con los protones del metileno C-10. Según estos datos, el hidroxilo terciario introducido en C-7(R^*) ocupa una posición pseudoaxial por la cara β de la molécula, *anti* a los grupos oxigenados de los carbonos C-6 y C-5 (Figura 2.2.1.1.2.2).

Además, se propone que la cadena de hidroximetilo pseudoecuatorial de C-7 (situada por la cara contraria) posee una conformación mayoritaria en la que

⁶⁴ Teniendo en cuenta la conformación 6H_5 del anillo de ciclohexeno, la conformación más estable para el anillo de trioxadisilepano constituido por el grupo protector TIPDS es un bote $O(5), Si-O(6)B$ (al igual que en el dieno **21**).

los grupos hidroxilo del 1,2-diol se encuentran en una disposición *sin*, estando probablemente estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (Figura 2.2.1.2.3).^{65,66}

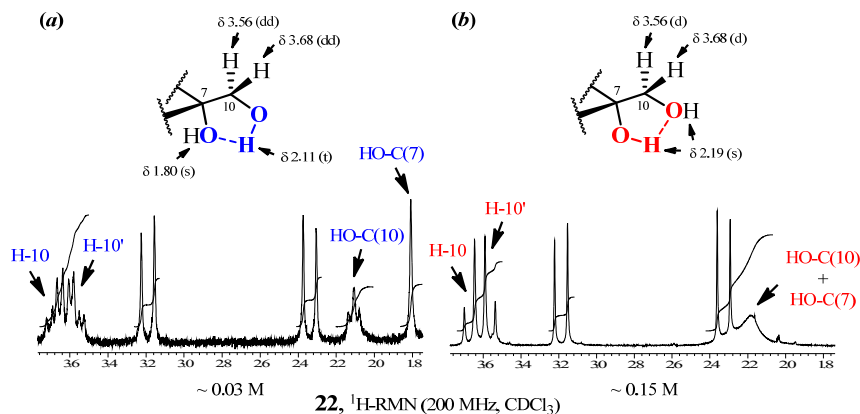


Figura 2.2.1.2.3. Detalle de dos espectros de ^1H -RMN del diol **22**, registrados a distinta concentración, que ilustran la posible formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre sus grupos hidroxilos: (a) O10-H \cdots O7 (en color azul), y (b) O7-H \cdots O10 (en color rojo).

En este sentido, al menos para disoluciones diluidas del diol **22** en CDCl_3 (~ 0.03 M), la multiplicidad de la señal de ^1H -RMN asignada a su hidroxilo primario, un triplete con una constante de acoplamiento tipo *gauche* (5.8 Hz) con

⁶⁵ Para unas discusiones generales sobre los enlaces de hidrógeno en compuestos orgánicos, ver: (a) Jeffrey, G.A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: Oxford, 1997. (b) Jeffrey, G.A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1991. (c) Etter, M.C. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 120-126. (d) Joesten, M.D. *J. Chem. Educ.* **1982**, 59, 362-366. (e) Kollman, P.A.; Allen, L.C. *Chem. Rev.* **1972**, 72, 283-303.

⁶⁶ Para algunos ejemplos de detección de enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares mediante espectroscopía de IR y ^1H -RMN, ver: (a) López de la Paz, M.; Ellis, G.; Pérez, M.; Perkins, J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 840-855. (b) Bernet, B.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 995-1021. (c) Pearce, C.M.; Sanders, J.K.M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1119-1124. (d) Fraser, R.R.; Kaufman, M.; Morand, P.; Govil, G. *Can. J. Chem.* **1969**, 47, 403-409.

los protones H-10 y H-10', denota la posible formación de un enlace de hidrógeno intramolecular O10-H...O7 donde el hidroxilo de C-10 participa como protón-donador (Figura 2.2.1.1.2.3 a). Sin embargo, cuando se aumenta la concentración de la disolución del diol (~0.15 M) desaparece el acoplamiento entre los protones del metileno C-10 y del hidroxilo primario. En estos casos, se sugiere el establecimiento de un enlace de hidrógeno intramolecular O7-H...O10, en el cual el oxígeno hidroxílico de C-10 actúa como protón-aceptor, siendo el hidroxilo terciario de C-7 el donador (Figura 2.2.1.2.3).

El estudio cristalográfico de difracción de rayos X⁶⁷ del diol **22** nos permite confirmar su estructura y las configuraciones relativas de sus cuatro centros estereogénicos 4*R**, 5*S**, 6*S** y 7*R**. Además analizaremos las diferencias existentes entre su ordenamiento en estado sólido y en disolución.

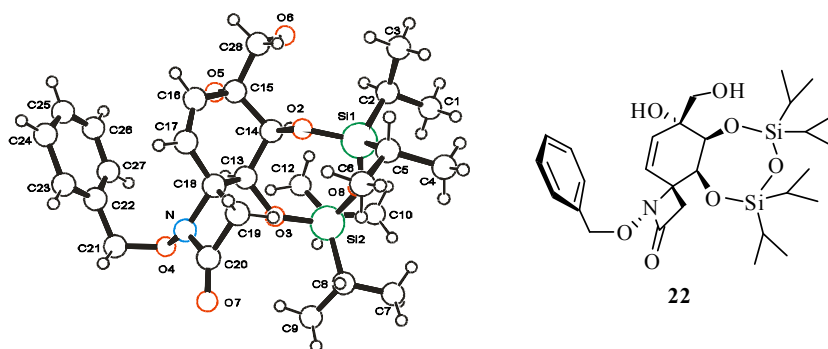


Figura 2.2.1.2.4. Representación de la estructura molecular del diol **22** obtenida por difracción de rayos X.

⁶⁷ La resolución del diol **22** por difracción de rayos X fue realizada por el Dr. Xavier Solans del Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Depósitos Minerales de la Universidad de Barcelona, empleando un difractómetro *MarResearch MAR345* con detector *Image plate* y el programa *SHELXL-97*.

En la Figura 2.2.1.2.4, se muestra la numeración de los átomos⁶⁸ y una representación de la molécula teniendo en cuenta los valores obtenidos para las coordenadas atómicas.⁶⁹

El grupo espacial es centrosimétrico, en la celda se encuentran los dos tipos de moléculas enantiomórficas, es decir con configuraciones opuestas.

El anillo de β -lactama presenta una conformación casi plana (el ángulo de torsión C18-N-C-20-C19 tiene un valor de 8.4(3)°). El anillo de benceno del grupo *N*-benciloxi es plano y se dispone *gauche* respecto al nitrógeno, como sugiere el valor del ángulo de torsión N-O4-C21-C22 de -69.0(4)° (existen diferentes torsiones entre los enlaces C18-N-O4-C21).

En el estado sólido, al igual que en disolución, el anillo de seis miembros C13-18 presenta una conformación de tipo semisilla 6H_5 con el grupo oxigenado O2 sobre C-14 en disposición axial y el oxígeno O3 sobre C-11 en ecuatorial (ambos en *anti* al nitrógeno). Por su parte, el anillo de siete miembros formado por O y Si presenta una conformación de tipo bote ${}^{O(5),Si-O(6)}B$ distorsionado, siendo el ángulo de torsión O2-C14-C13-O1 de 63.7(3)°.

El empaquetamiento de la estructura tiene lugar por medio de enlaces de hidrógeno intermoleculares O6-H...O7 entre el hidroxilo primario de una molécula y el grupo carboxílico de la β -lactama de otra, lo que forma largas cadenas monodimensionales (Figura 2.2.1.2.5).

⁶⁸ En la discusión de los datos cristalográficos del diol **22**, se empleará la misma numeración de átomos que la fijada al obtener su estructura por difracción de rayos X (ver Figura 2.2.1.2.4), excepto a la hora de definir su conformación mayoritaria, momento en que se usará la numeración establecida en el apartado de *Nomenclatura*.

⁶⁹ Las coordenadas atómicas obtenidas para el diol **22** se resumen en la Tabla A.8 del *Anexo A* de la presente Memoria.

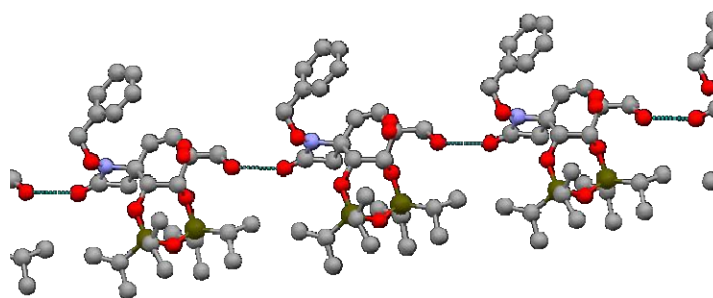


Figura 2.2.1.2.5. Representación del empaquetamiento del diol **22** por formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares.

Recapitulando, los datos de difracción de rayos X del diol racémico **22** confirman que: el esqueleto de espiro- β -lactama se mantiene intacto; los grupos hidroxilos sobre C-5 (ecuatorial) y C-6 (axial), *sin* entre ellos y *anti* al N-1, se encuentran protegidos con un grupo sililo TIPDS; y la disposición relativa de los grupos hidroximetilo (C-11 de *rac*-TTX) e hidroxilo incorporados sobre C-6, *anti* y *sin* al nitrógeno N-1, respectivamente, es la correcta y adecuada según el transcurso estereoquímico propuesto para la secuencia, olefinación de Wittig seguida de dihidroxilación.

Podemos afirmar que la dihidroxilación con OsO_4 dirigida por el oxígeno sobre C-6 se produce de forma totalmente regio y diastereoselectiva sobre el doble enlace exocíclico por la cara β de la molécula.

Suponiendo que la conformación mayoritaria del producto de partida es la más reactiva, la adición electrófila del oxidante al doble enlace exocíclico activado por el oxígeno sobre C-6, tendrá lugar preferentemente por la cara menos impedida, *anti* al grupo TIPDS en la posición C-6 (Figura 2.2.1.2.6).^{70,71}

⁷⁰ Sobre la estereoselectividad en la reacción de dihidroxilación de alcoholes alílicos, ver: (a) Cha, J.K.; Kin, N-S. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 1761-1795. (b) Para el caso de olefinas 1,1-disustituídas, ver: Evans, D.A.; Kaldor, S.W. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 1698-1700. (c) Como ejemplo de alcoholes alílicos cíclicos, ver: Donohoe, T.J.; Moore, P.R.; Beddoes, R.L. *J.*

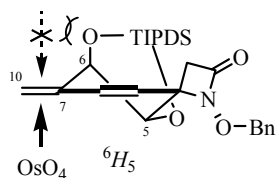
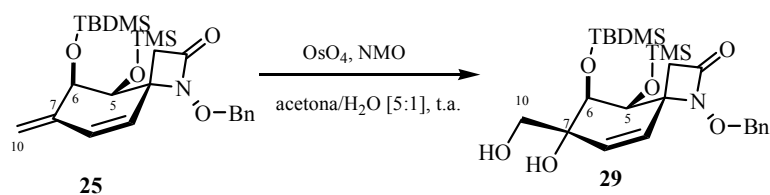


Figura 2.2.1.2.6. Diastereoselectividad facial en la dihidroxilación del dieno **21**.

Por su parte, la reacción de dihidroxilación del bisilildieno **25**, en las mismas condiciones experimentales condujo al correspondiente diol **29**⁷² (99%) como un sólido blanco (Esquema 2.2.1.2.2).⁷³



Esquema 2.2.1.2.2. Dihidroxilación regio- y diastereoselectiva del dieno **21**.

Chem. Soc., Perkin Trans. 1 **1997**, 43-51. Donohoe, T.J.; Garg, R.; Moore, P.R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 3407-3410.

⁷¹ Sobre los distintos modelos de estereoinducción propuestos para la dihidroxilación *anti* de alcoholes alílicos catalizada por OsO₄, ver: (a) modelo empírico de Kishi: Cha, J.K.; Christ, W.J.; Kishi, Y. *Tetrahedron* **1984**, 40, 2247-2255. *id.* *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 3943-3946. *ibid.* **1983**, 24, 3947-3950. (b) modelo del “efecto alcóxido interior”: Haller, J.; Strassner, T.; Houk, K.N. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8031-8034. Houk, K.N.; Moses, S.R.; Wu, Y.-D.; Rondan, N.G.; Jäger, V.; Schohe, R.; Fronczek, F.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3880-3882. Stork, G.; Kahn, M. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 3951-3954. (c) modelo propuesto por Vedejs: Vedejs, E.; Dent, W.H., III *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 6861-6862. Vedejs, E.; McClure, C.K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 1094-1096. (d) Sobre la dihidroxilación *sin* de alcoholes alílicos con OsO₄/TMEDA, ver: Donohoe, T.J.; Blades, K.; Moore, P.R.; Waring, M.J.; Winter, J.J.G.; Helliwell, M.; Newcombe, N.J.; Stemp, G. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 7946-7956. Donohoe, T.J.; Newcombe, N.J.; Waring, M.J. *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6881-6885. Donohoe, T.J.; Moore, P.R.; Waring, M.J.; Newcombe, N.J. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 5027-5030.

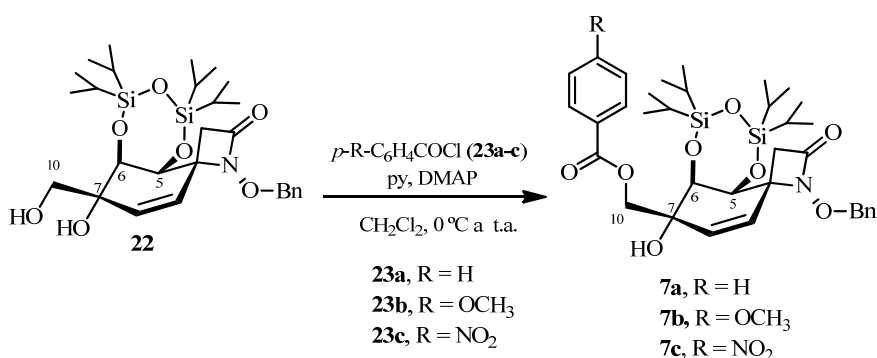
⁷² La conformación mayoritaria del diól **29** es ⁶H₅, la misma que el producto de partida y que el equivalente sintético **22**.

⁷³ Ver procedimiento en *Parte Experimental*.

2.2.1.3. Protección selectiva del hidroxilo primario del diol **22**

Se llevó a cabo la protección de manera regio- y quimioselectiva del hidroxilo primario (C-10)-OH utilizando distintos grupos benzoato como protectores.⁷⁴

La reacción del 1,2-diol **22** y los correspondientes cloruros de benzoilo **23a-c**, piridina y cantidades catalíticas de DMAP en diclorometano,⁷⁵ dio lugar a los correspondientes derivados benzoilados de sus hidroxilos primarios **7a-c**, todos ellos como sólidos blancos con rendimientos del 98%, 86% y 79%, respectivamente. (Esquema 2.2.1.3.1).



Esquema 2.2.1.3.1. Acilación regioselectiva del diol **22**.

La asignación estructural del benzoato **7a** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.3.1).⁷⁶

⁷⁴ Estos grupos protectores cumplen dos requisitos: (a) ser estables en las condiciones de reacción oxidantes utilizadas habitualmente para la dihidroxilación de dobles enlaces y (b) su desprotección debe ser selectiva frente al resto de los grupos protectores presentes en la molécula.

⁷⁵ Greene, T.W.; Wuts, P. G. M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Fourth edition. Wiley-Interscience: New York 2007; p. 254-259.

⁷⁶ La asignación de las señales de RNM del benzoato **7a** se apoyó en los experimentos NOESY-1D, COSY y HSQC.

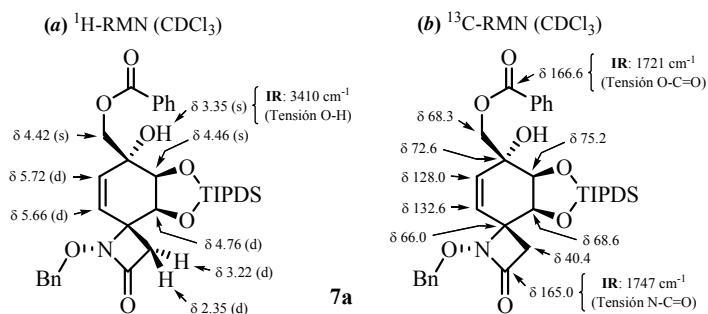


Figura 2.2.1.3.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del benzoato **7a**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales con apariencia de doblete a 8.04 ppm (2H, $J = 8.1$ Hz, Bz), de triplete a 7.60 ppm (1H, $J = 7.1$ Hz) y de triplete a 7.47 ppm (2H, $J = 7.6$ Hz), fueron asignados a los respectivos protones aromáticos de las posiciones *orto*, *para* y *meta* del nuevo grupo protector benzoilo. El singlete situado a 4.42 ppm que integra para dos protones se asignó a los protones metilénicos unidos a oxígeno H-10 y H-10'. El singlete localizado a 3.35 ppm se asignó al protón del grupo hidroxilo en C-7. El desapantallamiento observado para la señal de ^1H -RMN de uno de los isopropilos (1.13 ppm, 7H, s ancho) con respecto al resto (1.11-0.94 ppm, 21H, m) es asignado al efecto anisotrópico del anillo aromático del grupo benzoilo situado en sus proximidades (Figura 2.2.1.3.2). La conformación de la cadena de hidroximetilo en C-7 no pudo ser determinada.

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observan las señales correspondientes al carbono carboxílico (166.6 ppm) y los carbonos aromáticos (133.4, 129.5, 129.1 y 128.5) del grupo benzoilo introducido. La señal localizada a 68.3 ppm se asignó a carbono metilénico C-10.

A pesar de que en el espectro de ^1H -RMN de **7a** la señal asignada al protón H-6 del anillo de ciclohexeno aparece como un singlete, en el experimento

COSY se observa un acoplamiento a larga distancia entre el protón olefinico H-8 (5.72 ppm) y el protón ecuatorial H-6 (4.46 ppm). Por lo que se deduce que la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del benzoato **7a** es una semisilla 6H_5 (Figura 2.2.1.1.3.2). Además, el protón H-8 presenta NOE con los protones metilénicos H-10 y H-10' (aparecen como un singlete a 4.42 ppm) y con H-9, mientras que H-5ax presenta NOE con H-6ec y con el hidroxilo de C-7.

La conformación más estable para el anillo de trioxadisililepano constituido por el grupo TIPDS es un bote $O(5),Si-O(6)B$. (Figura 2.2.1.3.2).

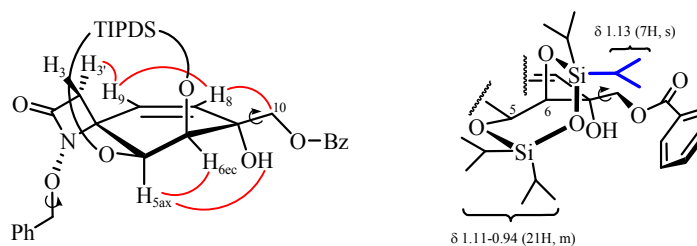


Figura 2.2.1.3.2. Relación de NOEs (en color rojo) más significativos del benzoato **7a** y conformación propuesta para su anillo de trioxadisililepano (en color azul se indica el grupo isopropilo del protector TIPDS afectado por el cono de desapantallamiento del anillo aromático del benzoilo).

Respecto al benzoato **7b**, su asignación estructural se realizó en función de sus datos espectroscópicos⁷⁷, siendo estos similares a los obtenidos para el benzoato **7a**, como se refleja en la Figura 2.2.1.3.3.

⁷⁷ La asignación de las señales de RNM del benzoato **7b** se apoyó en los experimentos NOESY-1D, COSY y HSQC.

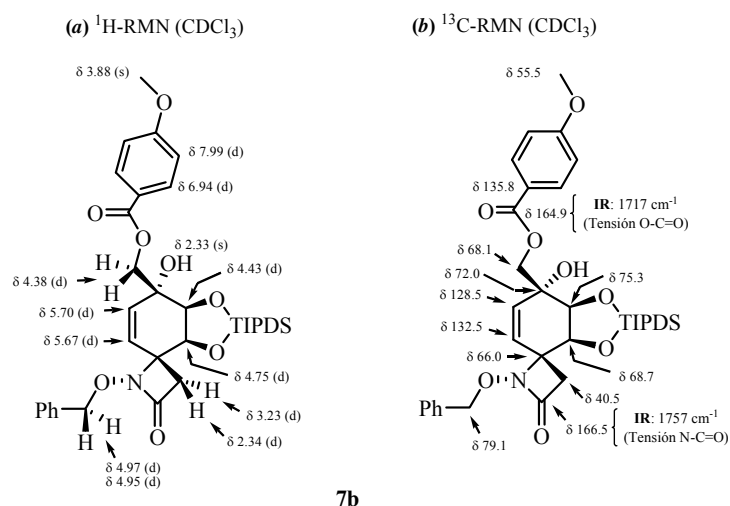


Figura 2.2.1.3.3. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del benzoato **7b**.

Al igual que para el benzoato **7a**, la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexeno de **7b** es una semisilla 6H_5 deducible de la constante a larga distancia, observada en el experimento COSY, entre el protón H-8 y H-6ec y de las constantes de acoplamiento, HMBC y NOESY observados. (Figura 2.2.1.3.4).

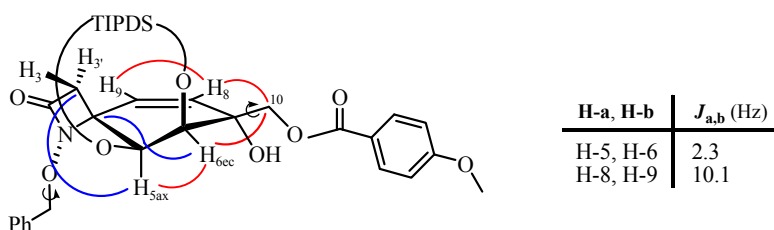


Figura 2.2.1.3.4. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del benzoato **7b**.

Conformación tipo semisilla 6H_5 .

Por último, de la misma manera la asignación estructural del benzoato **7c** se realizó en función de sus datos espectroscópicos⁷⁸ (Figura 2.2.1.3.5), siendo estos similares a los obtenidos para los benzoatos **7a** y **7b**.

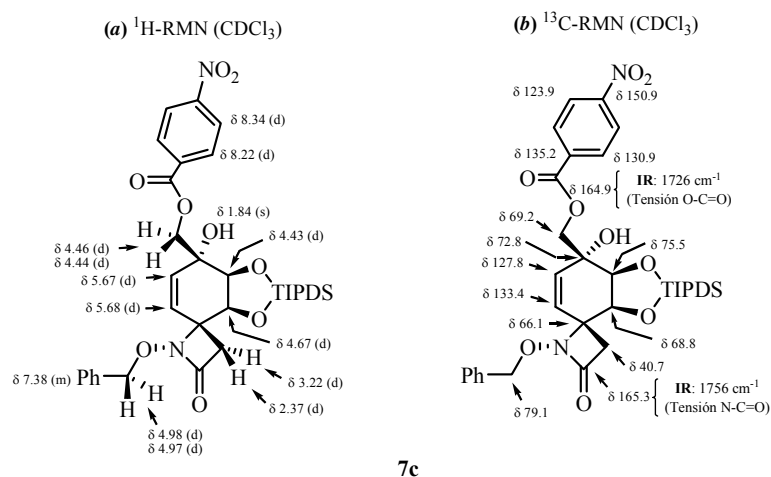


Figura 2.2.1.3.5. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del benzoato **7c**.

Al igual que el benzoato **7a** y la **7b** conformación mayoritaria del anillo de ciclohexeno de **7c** es una semisilla 6H_5 deducible de las constantes de acoplamiento y las correlaciones HMBC y NOESY observadas. (Figura 2.2.1.3.6).

⁷⁸ La asignación de las señales de RMN del benzoato **7b** se apoyó en los experimentos NOESY-1D, COSY y HSQC.

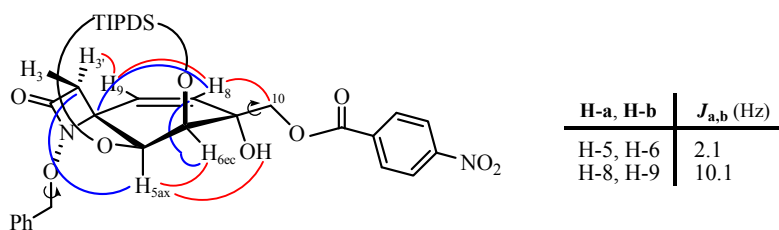
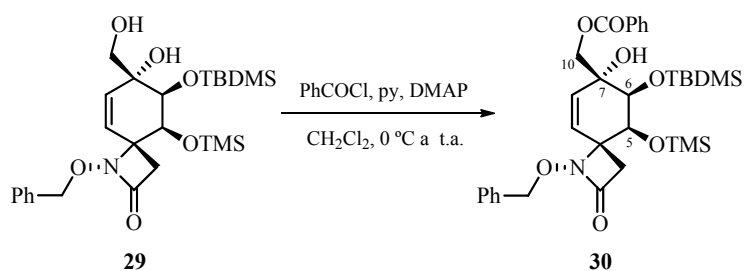


Figura 2.2.1.3.6. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del benzoato **7c**.

Conformación tipo semisilla 6H_5 .

Por todo lo anterior, podemos asegurar que los benzoatos **7a-c** obtenidos por la protección del hidroxilo primario presentan la misma conformación mayoritaria para el anillo de ciclohexeno, es decir, una semisilla 6H_5 .

Por su parte, la reacción de protección selectiva del hidroxilo primario (C-10)-OH del diol **29**, utilizando el mismo procedimiento experimental, condujo al correspondiente benzoato **30**⁷⁹ (93%) como un sólido blanco (Esquema 2.2.1.3.2).⁸⁰



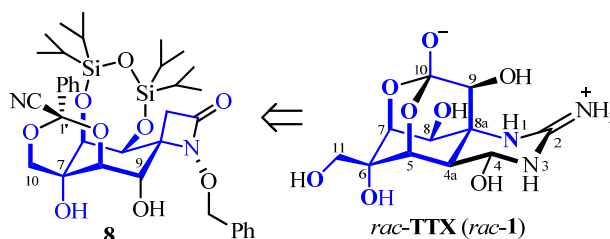
Esquema 2.2.1.3.2. Reacción de benzoilación del diol **29**.

⁷⁹ La conformación mayoritaria del diol **29** es 6H_5 , la misma que el producto de partida y que el equivalente sintético **22**.

⁸⁰ Ver procedimiento en *Parte Experimental*.

2.2.1.4. Epoxidación diastereoselectiva del doble enlace $\Delta^{8(9)}$ de los benzoatos 7a-c

De acuerdo con el esquema retrosintético propuesto en el apartado de *Plan de Trabajo* (Esquema I, ruta A), el cianobenciliden acetal **8**, será el siguiente intermedio a sintetizar. Este compuesto incorpora la funcionalidad oxigenada en C-5 con la estereoquímica adecuada, tal como se encuentra en la *rac*-TTX (*rac*-**1**). (Esquema 2.2.1.4.1). Además, posee la funcionalidad adecuada en los futuros carbonos C-6, C-7 y C-8 de la *rac*-TTX (*rac*-**1**) y la funcionalidad adecuada para la posterior incorporación de los carbonos C-2 y C-4.

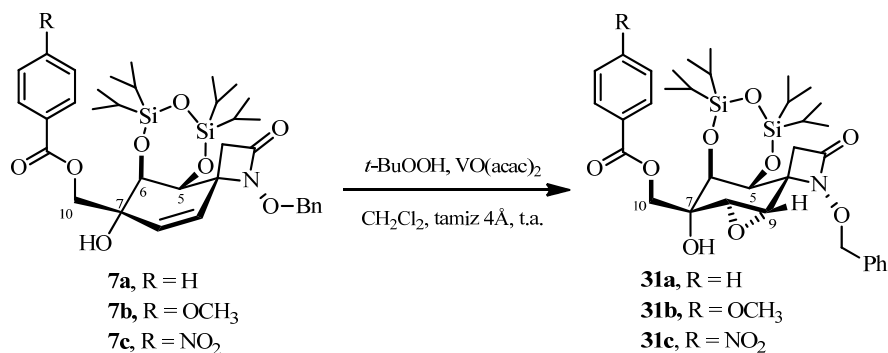


Esquema 2.2.1.4.1. Esquema retrosintético del cianobenciliden acetal **8**, y su relación estructural con *rac*-TTX (*rac*-**1**) (en color azul se muestra su esqueleto común).

El cianobenciliden acetal **8** se prepara a partir del benzoato **7a** mediante la secuencia sintética de: i) reacción de epoxidación del doble enlace y ii) apertura regio- y estereoselectiva del epóxido.

La epoxidación completamente regioselectiva de los benzoatos **7a-c** se llevó a cabo con hidropéroxido de *tert*-butilo (TBHP) catalizada por vanadio, utilizando como precatalizador el complejo bis(acetilacetato) de oxovanadio (IV) ($\text{VO}(\text{acac})_2$),⁸¹ sólido estable, que es oxidado por el TBHP al perteneciente vanadato (V) catalíticamente activo, $\text{VO}(\text{OR})_3$.

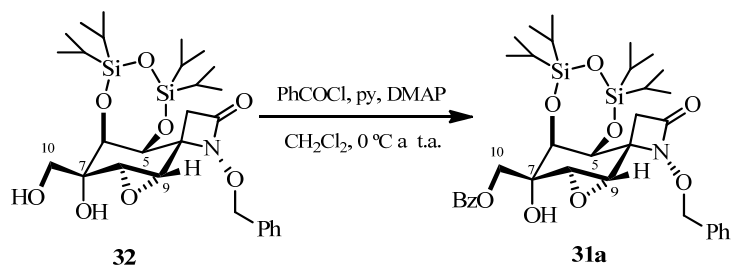
⁸¹ (a) König, C. M.; Harms, K.; Ulrich Koert, U. *Org Lett.* **2007**, 9, 4777-4779. (b) Trost, B. M.; Wroblewski, S. T.; Chisholm, J. D.; Harrington, P. E.; Jung M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 13589-13597.



Esquema 2.2.1.4.2. Reacción de epoxidación de los benzoatos **7a-c**.

El procedimiento experimental consistió en adicionar, sobre la disolución de los correspondientes benzoatos **7a-c** en diclorometano, el hidropérido de terc-butilo y tamiz molecular de 4 de diámetro de poro. A los 10 minutos se añadió el complejo de oxavanadio VO(acac)₂. La reacción se completa en 4 días a temperatura ambiente, y tras su correspondiente aislamiento y purificación se obtienen los epoxialcoholes **31a-c**, con unos rendimientos del 87%, 68% y 52%, respectivamente (Esquema 2.2.1.4.2).

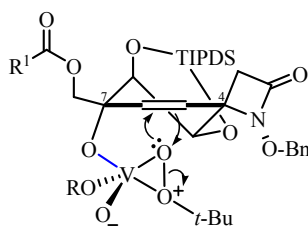
El epoxialcohol **31a** también se preparó a partir del epóxido **32** mediante protección selectiva de su hidroxilo primario de C-10 con el grupo benzoilo, obteniéndose con un 62% de rendimiento (Esquema 2.2.1.4.3).



Esquema 2.2.1.4.3. Reacción de formación del benzoato **31a** mediante benzoilación selectiva.

En epoxialcoholes todos los casos, como era de esperar, la epoxidación del doble enlace del alcohol alílico está dirigida por el grupo hidroxilo de C-7 produciéndose la transferencia del átomo de oxígeno del reactivo preferentemente, por la cara α de la molécula. Se obtuvieron los epóxidos deseados, *sin* al hidroxilo alílico de C-7, de forma totalmente diastereoselectiva.

Proponemos que la selectividad facial está controlada por la formación de un quelato que enlaza el oxígeno del hidroxilo alílico de C-7 y el TBHP al centro metálico (V^{5+}) del complejo activo. (Figura 2.2.1.4.1).⁸²



Clave: R¹ = Ph (**31a**); (C₆H₄)-OCH₃ (**31b**); (C₆H₄)-NO₂ (**31c**); RO = ligando acetilacetato.

Figura 2.2.1.4.1. Diastereoselección facial en la epoxidación de los benzoatos **7a-c** respectivamente con TBHP/VO(acac)₂ (vía quelato).

La asignación estructural del epóxido **31a** se realizó en base a sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.4.2).

⁸² (a) En la Figura se considera que la conformación mayoritaria de los sustratos de partida **7a-c** (⁶H₅) es a su vez la más reactiva. (b) Sobre las propuestas mecanísticas descritas en la literatura para los procesos de epoxidación, ver: (a) Berti, G. *Top. Stereochem.* **1973**, 7, 93-251. (b) Adam, W.; Wirth, T. *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 703-710. (c) Sharpless, K.B.; Verhoeven, T.R. *Aldrichim. Acta* **1979**, 12, 63-73.

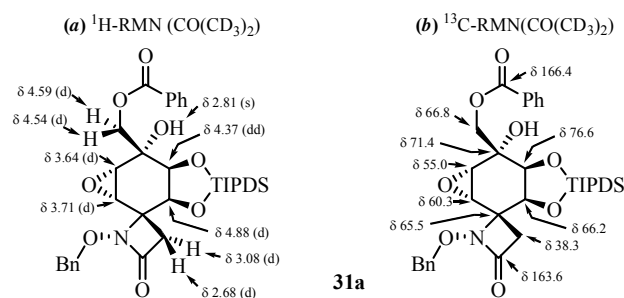


Figura 2.2.1.4.2. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del epóxido **31a**

En el espectro de ^1H -RMN (en acetona perdeuterada), las señales que aparecen como un doblete a 3.71 ppm ($J = 3.7$ Hz) y un doblete de dobletes a 3.64 ppm ($J = 3.7$ y 1.3 Hz) se asignaron a los correspondientes protones oxiránicos H-9 y H-8, respectivamente. El doblete localizado a 4.88 ppm ($J = 2.4$ Hz) se asignó al protón H-5, mientras que el doblete de dobletes que aparece a 4.37 ppm ($J = 2.4$ y 1.3 Hz) se asignó al protón H-6. Los protones localizados a 4.59 y 4.54 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 11.5 Hz, se asignaron al sistema AB constituido por los protones metilénicos (H-10 y H-10') y el singlete situado a 4.98 ppm se asignó al hidroxilo terciario de C-7. Por último, el sistema AB formado por los protones metilénicos de la β -lactama se presentan como dos dobletes con una constante de acoplamiento de 13.5 Hz, centrados a 3.08 (H-3) y 2.68 ppm (H-3').

En el espectro de ^{13}C -RMN, las señales asignadas a los dos carbonos sp^3 unidos al oxígeno oxiránico aparecen a 60.3 para C-9 y 55.0 para C-8.

En el espectro de IR, se mantienen las bandas de la vibración de tensión de los enlaces O-H (3430 cm^{-1}) y N-C=O de la β -lactama (1767 cm^{-1}).⁸³

⁸³ Las bandas de tensión C-O-C esperables para el grupo oxirano pueden estar solapadas con las intensas bandas de flexión Si-CH₃ (1273 cm^{-1}) y de tensión Si-O-C (823 cm^{-1}) originadas por el grupo protector sililado TIPDS.

Por último, el espectro de masas *LRMS* (*API-ES*⁺) presenta los picos apropiados *m/z*: 684 (*M*+*H*)⁺, 706 (*M*+*Na*)⁺ y 1389 (2*M*+*Na*)⁺.

Tanto la estereoquímica relativa del epóxido **31a** como su conformación mayoritaria en disolución fueron determinadas mediante el análisis de sus constantes de acoplamiento y sus NOEs (Figura 2.2.1.4.3).

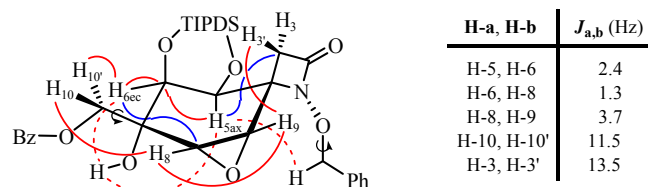


Figura 2.2.1.4.3. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del epoxialcohol **31a**.

Conformación tipo semisilla ⁶*H*₅.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del epóxidoalcohol **31a** es una semisilla ⁶*H*₅ (Figura 2.2.1.4.3), deducible de la existencia de una constante de acoplamiento a larga distancia (*J*_W = 1.3 Hz) entre el protón H-6_{ec} y el protón oxiránico H-8 (también observada en el COSY). Además, el protón H-5_{ax} presenta NOE con el hidroxilo pseudoaxial de C-7 y no lo da con el protón H-3. Por otro lado, se observan correlaciones a tres enlaces del protón H-5_{ax} con el carbono metilénico de la β-lactama C-3 y del protón H-6 con los carbonos C-4 y C-8. (Figura 2.2.1.4.3).

A pesar de que no se observa NOE del protón H-3' de la β-lactama con ambos protones oxiránicos, sólo se observa con H-9, la disposición de ambos protones por la cara α de la molécula, y consecuentemente que el oxígeno oxiránico se ha introducido *sin* respecto al hidroxilo de C-7 (siendo 8*S** y 9*S** las configuraciones relativas de los nuevos centros estereogénicos) se asignó por

comparación de sus datos de ^1H -RMN registrados en CDCl_3 con los encontrados para otros *cis*-epoxi-alcoholes. (Figura 2.2.1.4.4).

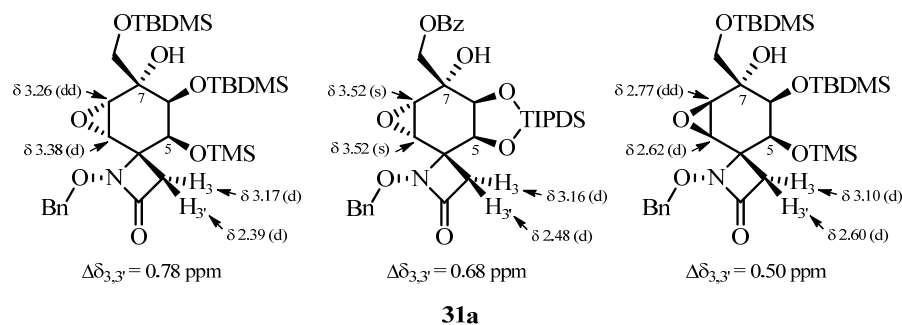


Figura 2.2.1.4.4. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN (en CDCl_3) de los protones β -lactámicos en los epoxialcoholes.

Además, los NOEs que presentan H-10 (4.59 ppm) con H-8 y H-10' (4.54 ppm) con H-6ec, junto con la ausencia de NOEs con el OH (al menos en $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$), sugieren que la conformación mayoritaria del oximetilo sobre C-7 dispone al oxígeno acilado *sin* (entre *sinclinal* y *sinperiplanar*)⁸⁴ con respecto al grupo hidroxilo.

Por su parte, la asignación estructural del epóxidoalcohol **31b** se realizó en base a sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.4.5).

⁸⁴ El ángulo diedro $\text{BzO-C}(10)\text{-C}(7)\text{-OH}$ sería de $30\text{-}45^\circ$, manteniendo una situación intermedia entre *sinperiplanar* (de 0° a $\pm 30^\circ$) y *sinclinal* (de -30° a -90°). Ver: IUPAC, Organic Chemistry Division: Commission on Nomenclature of Organic Chemistry, Commission on Physical Organic Chemistry *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 2193-2222.

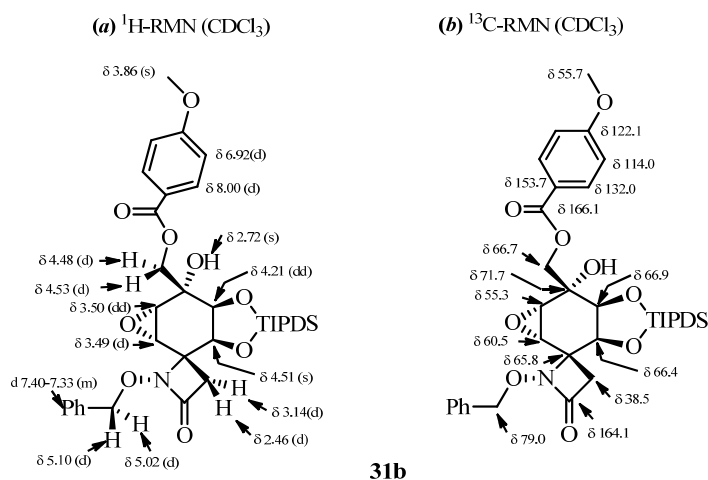


Figura 2.2.1.2.5. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del epoxialcohol **31b**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que aparecen como un doblete de dobletes a 3.50 ppm ($J = 3.8$ y 1.2 Hz) y un doblete a 3.49 ppm ($J = 3.8$ Hz) se asignaron a los correspondientes protones oxiránicos H-8 y H-9, respectivamente. El singlete que localizado a 4.51 ppm se asignó al protón H-5, mientras que el doblete de dobletes que aparece a 4.21 ppm ($J = 2.0$ y 1.2 Hz) se asignó al protón H-6. Los protones localizados a 4.53 y 4.48 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.4 Hz, se asignaron al sistema *AB* constituido por los protones metilénicos (H-10 y H-10') y el singlete situado a 2.72 ppm se asignó al hidroxilo terciario de C-7. Por último, el sistema *AB* formado por los protones metilénicos de la β -lactama se presentan como dos dobletes con una constante de acoplamiento de 13.9 Hz, centrados a 3.14 (H-3) y 2.46 ppm (H-3').

En el espectro de ^{13}C -RMN, los carbonos del oxirano C-8 y C-9 aparecen a 55.3 y 60.5 ppm, respectivamente.

En el espectro de IR, se observan las bandas de la vibración de tensión de los enlaces O-H (3490 cm^{-1}) y N-C=O de la β -lactama (1768 cm^{-1}).

Por último, en el espectro de masas *LRMS* (*API-ES*⁺) presenta los picos apropiados m/z : 715 ($M+H$)⁺, 737 ($M+Na$)⁺ y 1450 ($2M+Na$)⁺.

Al igual que ocurría en el epoxialcohol **31a**, la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano de **31b** es una semisilla ⁶H₅ (Figura 2.2.1.4.6), tal como se deduce de la constante de acoplamiento a larga distancia ($J_w = 1.2$ Hz) observada entre el protón oxiránico H-8 y H-6ec (observado además en el experimento COSY), así como de la presencia del NOE entre H-5ax y el hidroxilo pseudoaxial de C-7. La ausencia de un NOE entre H-5ax con el protón β-lactámico H-3 apoya la asignación realizada.

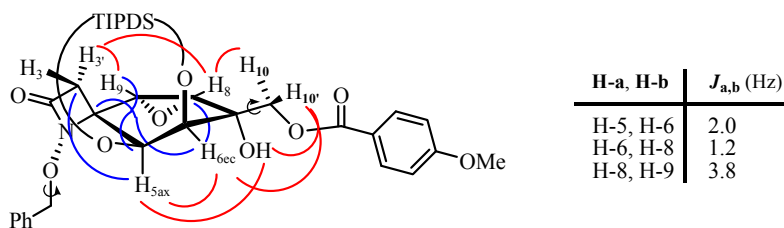


Figura 2.2.1.4.6. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del epoxialcohol **31b**.

Conformación tipo semisilla ⁶H₅.

Los NOEs observados entre el protón H-3' de la β-lactama y los dos protones del anillo de oxirano (H-8 y H-9), refuerzan que estos se encuentran por la cara α de la molécula, y consecuentemente que el oxígeno oxiránico se ha introducido sin con respecto al hidroxilo de C-7, siendo 8S* y 9S* la configuración relativa de los nuevos centros estereogénicos.

Por otra parte, los NOEs que presentan los protones del oximetilo H-10 con protón oxiránico H-8 y H-10' con H-6 y con el grupo hidroxilo de C-7, sugieren que la cadena de oximetilo pseudoecuatorial sobre C-7, adquiere

mayoritariamente una conformación en la que el oxígeno acilado O-10 se dispone *antiperiplanar* respecto al carbono C-6. (Figura 2.2.1.4.6).

Por último, la asignación estructural del epoxialcohol **31c** se realizó en base a sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.4.7).

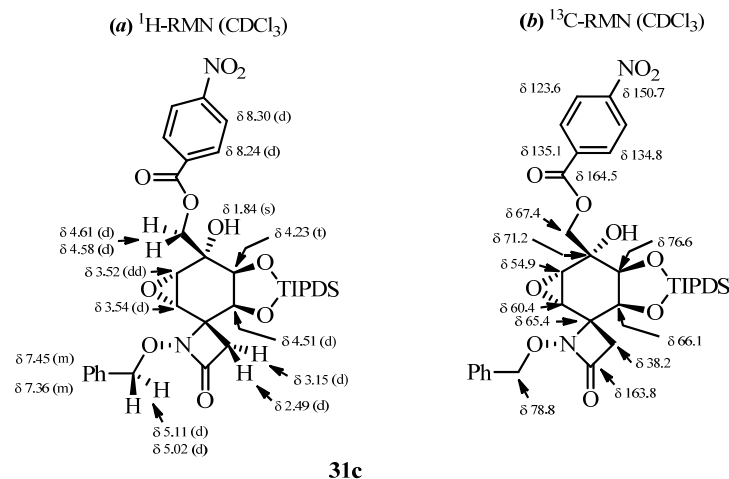


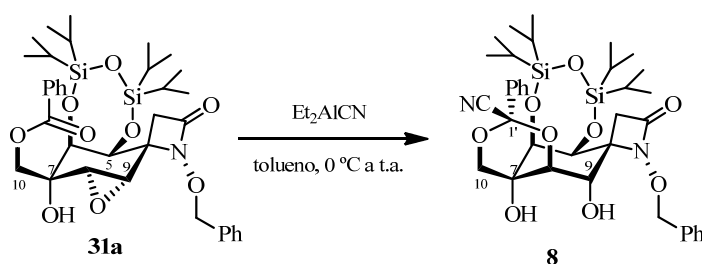
Figura 2.2.1.4.7. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del epoxialcohol **31c**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que aparecen como un doblete a 3.54 ppm ($J = 3.7$ Hz) y un doblete de dobletes a 3.52 ppm ($J = 3.8$ y 1.1 Hz) se asignaron a los correspondientes protones oxiránicos H-9 y H-8, respectivamente. El doblete que localizado a 4.51 ppm ($J = 2.1$ Hz) se asignó al protón H-5, mientras que el triplete que aparece a 4.23 ppm ($J = 1.3$ Hz) se asignó al protón H-6. Los protones localizados a 4.61 y 4.58 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 11.8 Hz, se asignaron al sistema *AB* constituido por los protones metilénicos (H-10 y H-10') y el singlete situado a 1.84 ppm se asignó al hidroxilo terciario de C-7. Por último, el sistema *AB* formado por los protones metilénicos de la β -lactama se presentan como dos dobletes con una constante de acoplamiento de 13.8 Hz, centrados a 3.15 (H-3) y 2.49 ppm (H-3').

2.2.1.5. Apertura del epoxialcohol 31a. Síntesis del cianobenciliden

acetal 8

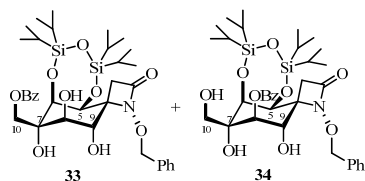
La reacción del epoxialcohol **31a** y el Et_2AlCN en tolueno, después de 24 horas a temperatura ambiente y posterior purificación, dio lugar al cianobenciliden acetal **8** con un 92% de rendimiento. (Esquema 2.2.1.5.1).



Esquema 2.2.1.5.1. Preparación del cianobenciliden acetal **8**.

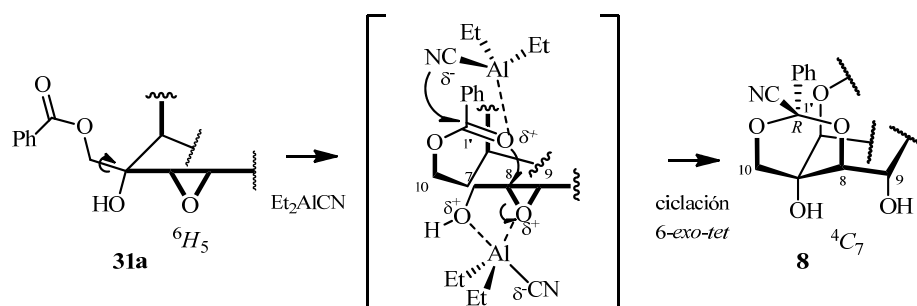
Aunque los datos espectroscópicos del crudo de reacción muestran al cianobenciliden acetal **8** como único producto, la purificación cromatográfica (SiO_2) lo hidroliza parcialmente dando lugar a una mezcla equimolecular de los correspondientes *trans*-1,2-dioles regioisómeros benzoilados en C-10 y C-8 (**33** y **34**, rto. 8%), y en consecuencia se obtiene como un sólido blanco con un rendimiento del 66% (Esquema 2.2.1.5.1). A pesar de ser inestable en medios ligeramente ácidos,⁸⁵ en condiciones neutras y en estado sólido, el

⁸⁵ Los hidroxibenzoatos regioisómeros **33** (primario) y **34** (secundario), obtenidos por hidrólisis ácida del cianobenciliden acetal **8**, no se separaron por cromatografía en columna y su proporción [1:1] en la mezcla se determinó por ^1H -RMN (ver *Parte Experimental*).



cianobenciliden acetal **8** es estable y puede ser almacenado a temperatura ambiente durante semanas.

El mecanismo propuesto para la formación del cianobenciliden acetal **8** es el que aparece en el Esquema 2.2.1.5.2. El proceso se inicia con una rápida activación y adición $A_{1,2}$ del Et_2AlCN al carboxilo del grupo benzoato primario de **31a**. A continuación, el oxígeno de la especie intermedia generada en C-1' actúa como nucleófilo en la ciclación intramolecular *6-exo-tet* abriendo regioselectivamente el epóxido por ataque *anti* sobre C-8. Este mecanismo se activa por la coordinación del oxígeno oxiránico con el aluminio deficiente en electrones, del Et_2AlCN , a la vez que se forma el 1-cianobenciliden-acetal cíclico tipo 1,3-dioxano presente en **31a** por la cara α de la molécula.



Esquema 2.2.1.5.2. Propuesta mecanística en la formación del cianobenciliden acetal **8**.

La asignación estructural del cianobenciliden acetal **8** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.5.1).

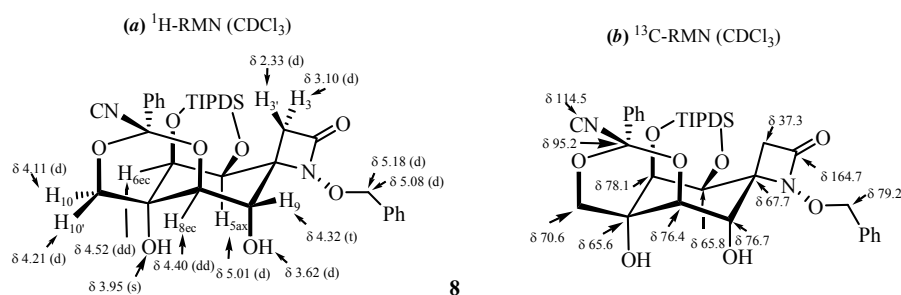


Figura 2.2.1.5.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del cianobenciliden acetal **8**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 5.01 ppm ($J = 3.6$ Hz), un doblete de dobletes a 4.52 ppm ($J = 3.6$ y 1.4 Hz), otro doblete de dobletes a 4.40 ppm ($J = 2.8$ y 1.4 Hz) y un aparente triplete a 4.32 ppm ($J = 3.2$ Hz), se asignaron respectivamente a los protones H-5, H-6, H-8 y H-9 del anillo de ciclohexano. Los dobletes situados a 4.21 y 4.11 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.1 Hz, fueron asignados al sistema *AB* constituido por los protones del metileno C-10, H-10' y H-10 respectivamente. El doblete situado a 3.62 ppm ($J = 3.5$ Hz) se adjudicó al nuevo hidroxilo secundario de C-9, mientras que el singlete a 3.95 ppm se asignó al hidroxilo terciario de C-7. Finalmente, el sistema *AB* formado por los protones β -lactámicos se muestra como dos dobletes aparentes ($J_{AB} = 14.2$ Hz) centrados a 3.10 ppm (H-3) y 2.33 ppm (H-3').⁸⁶

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observa a 95.2 ppm la señal atribuida al nuevo carbono cuaternario doblemente oxigenado C-1'. La señal situada a 114.5 ppm se asignó al carbono del grupo ciano introducido. El resto de los carbonos

⁸⁶ La diferencia entre los desplazamientos químicos de los protones β -lactámicos (H-3 y H-3') del acetal **8** (δ 3.10 y 2.33), $\Delta\delta_{3,3'} = 0.77$ ppm, es ligeramente mayor que la observada para el epóxido de partida **31a** (δ 3.16 y 2.48), $\Delta\delta_{3,3'} = 0.68$ ppm. Los valores de $\Delta\delta_{3,3'}$ se calculan según el siguiente criterio: $\Delta\delta_{3,3'} = \delta_{\text{H-3}} - \delta_{\text{H-3'}}$.

del anillo 1,3-dioxánico generado aparecen a 70.7 ppm (C-10), 76.4 ppm (C-8) y 65.6 ppm (C-7).

En el espectro de IR, la banda de absorción observada a 2218 cm^{-1} es debida a la vibración de tensión del enlace $\text{C}\equiv\text{N}$. La banda de tensión $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ característica de la β -lactama se encuentra a 1748 cm^{-1} y la banda de tensión $\text{O}-\text{H}$ originada por los grupos hidroxilos aparece a 3451 cm^{-1} .

En el espectro de masas *LRMS (EI)* aparece el pico molecular m/z 710 (M^+ , 0.2) y en *LRMS (API-ES⁺)* se aprecian los correspondientes picos m/z 711 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 733 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ y 1444 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, así como un pico m/z 684 ($\text{M}-26$)⁺ asignado a la pérdida de cianuro.

Para determinar la configuración relativa de los nuevos centros estereogénicos formados (C-8, C-9 y C-1') y la conformación mayoritaria en disolución del cianobenciliden acetal **8** se llevó a cabo el análisis de las constantes de acoplamiento y los experimentos NOESY. (Figura 2.2.1.5.2).

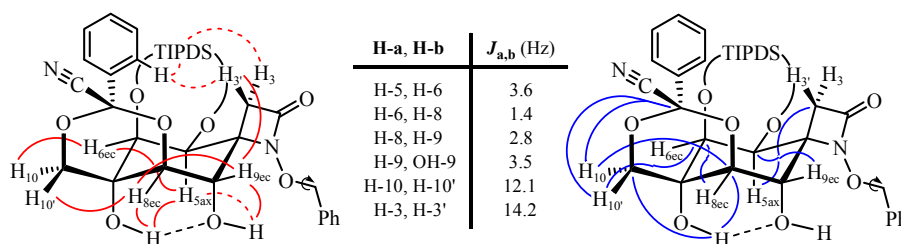


Figura 2.2.1.5.2. Relación de constantes de acoplamiento, NOEs (en color rojo) y correlaciones HMBC (en color azul) más significativos del cianobenciliden acetal **8**.

Observamos una constante de acoplamiento a larga distancia entre los protones H-6 y H-8 ($J_w = 1.4\text{ Hz}$) y cada uno de ellos presenta una constante de acoplamiento tipo gauche, H-6 con H-5ax ($J = 3.6\text{ Hz}$) y H-8 con H-9ec ($J = 2.8\text{ Hz}$) por lo que ambos se encuentran en la posición ecuatorial. El protón H-9ec se

muestra como un triplete aparente debido al acoplamiento con H-8ec y con su hidroxilo vecinal ($J = 3.5$ Hz, observado también en el COSY). Además, H-9ec presenta un NOE con el protón H-3' de la β -lactama. El protón H-5ax presenta NOE con los grupos hidroxilos axiales de C-7 y C-9, siendo este último de menor intensidad que el primero.⁸⁷ Por otro lado, los protones H-10 (4.21 ppm) y H-10' (4.11 ppm) del 1,3-dioxirano del nuevo ciclo formado da lugar a NOEs con los protones del ciclohexano H-6ec y H-8ec, respectivamente.

Con todos estos datos, podemos asegurar que el anillo de ciclohexano del cianobencilien acetal **8** presenta una conformación mayoritaria 4C_7 en la que el oxígeno introducido por la cara α sobre C-8 y el hidroxilo generado en C-9 por la apertura del epóxido se encuentran en una disposición relativa *transdiaxial*. Por otro lado, el nuevo anillo 1,3-dioxano, generado en la reacción, presenta una conformación mayoritaria 7C_1 .⁸⁸

El nuevo centro generado en C-1' presenta una configuración R^* , en la que el fenilo ocupa una posición ecuatorial y el grupo ciano axial. Esta conformación se deduce por la existencia de NOE entre los protones en *orto* al anillo aromático (multiplete que integra para dos protones a 7.56-7.50 ppm) con el protón H-3' de la β -lactama y con el grupo TIPDS.

El anillo de siete miembros constituido por el grupo protector TIPDS es un bote ${}^{O(5),Si-O(6)}B$. En el espectro de 1H -RMN, los dos multipletes (0.83-0.75 ppm y 0.63-0.56 ppm), que integran para tres protones cada uno, se asignaron a uno de los isopropilos del TIPDS. Este presenta un desplazamiento a campo alto atribuido al apantallamiento inducido por el anillo aromático de C-1'situado en sus proximidades (Figura 2.2.1.5.3). El metilo que se encuentra a mayor

⁸⁷ El especial desapantallamiento observado para H-5 en 1H -RMN (5.01 ppm) se atribuye a su proximidad a las nubes electrónicas de los átomos de oxígeno axiales de C-7 y C-9.

⁸⁸ La conformación 7C_1 del 1,3-dioxano queda asentada por las correlaciones a tres enlaces observadas en HMBC de H-10 con C-8 y de H-10' con C-6 y de ambos (H-10 y H-10') con C-1' (siendo mayor con H-10 que con H-10').

desplazamiento da un NOE con el protón H-3 de la β -lactama y con uno de los protones en *orto* del bencilidenacetal.

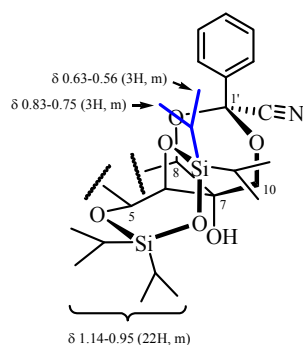
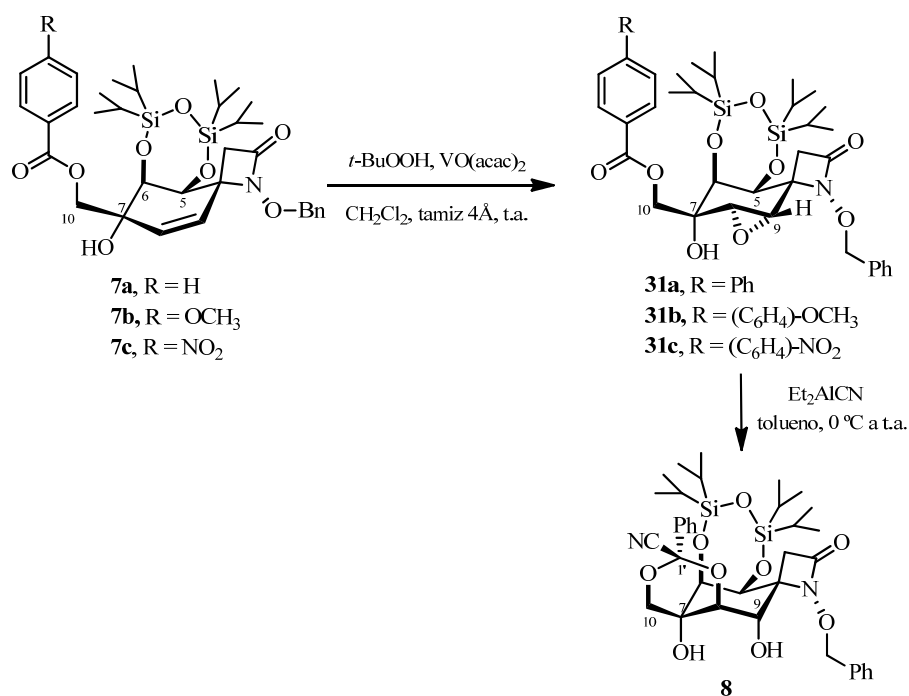


Figura 2.2.1.5.3. Conformación $O(5), Si-O(6)B$ propuesta para el anillo de trioxadisilepano. El grupo isopropilo del protector TIPDS afectado por el cono de apantallamiento del anillo aromático de la posición C-1' en color azul.

Además, debemos destacar la existencia de un enlace de hidrógeno intramolecular del hidroxilo terciario de C-7 con el hidroxilo secundario de C-9. Esto se deduce de la existencia de NOEs entre el protón del hidroxilo terciario (C(7)OH) con H-8ec y H-5ax y las intensas correlaciones a tres enlaces observadas en HMBC con C-8 y C-10. Destacando la ausencia de NOEs del hidroxilo terciario con los protones metilénicos H-10 y H-10'.

En resumen, el benciliden acetal 8 se prepara a partir del benzoato 31a mediante la secuencia sintética que implica: i) epoxidación diastereoselectiva por la cara β y ii) apertura regio- y diastereoselectiva del correspondiente epóxido con un rendimiento del 63% (Esquema 2.2.1.5.3).



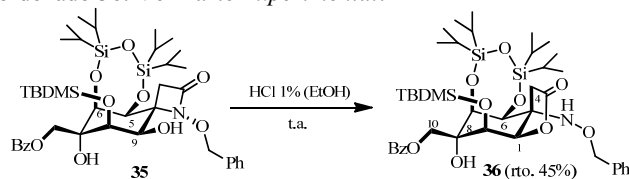
Esquema 2.2.1.5.3. Esquema sintético del cianobenciliden acetal **8**.

2.2.1.6. Reactividad del cianobenciliden acetal **8**

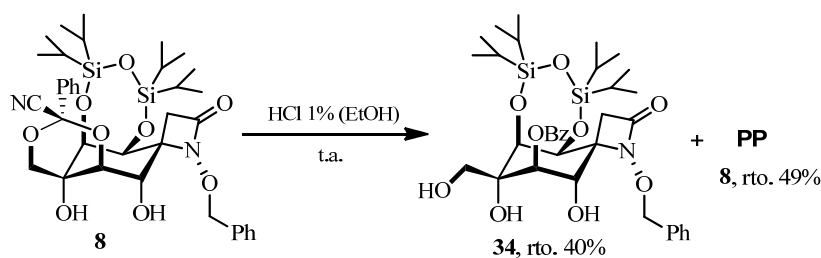
2.2.1.6.1. Preparación del benzoatotriol **34** a partir del cianobenciliden acetal **8**

La reacción del cianobenciliden acetal **8** con una disolución de ácido clorhídrico al 1% en etanol⁸⁹ condujo tras cuatro días al benzoatotriol **34** como un

⁸⁹ Cuando se utilizan las mismas condiciones de reacción con el sililoxibenzoato **35** se obtiene el compuesto reordenado **36**. Ver *Parte Experimental*.



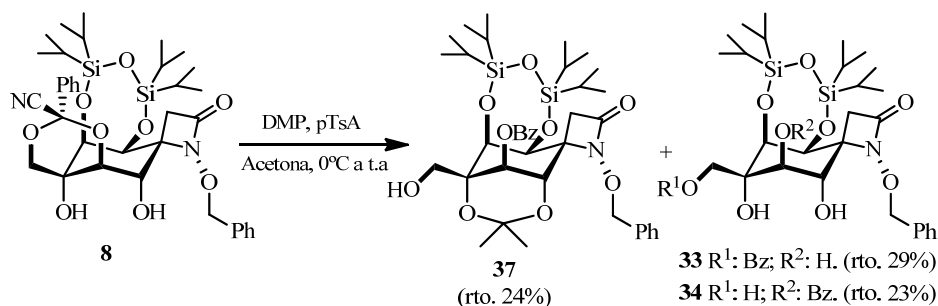
aceite amarillo con un rendimiento del 40% y se recuperó un 49% del producto de partida, el cianobenciliden acetal **8** (Esquema 2.2.1.6.1.1).



Esquema 2.2.1.6.1.1. Preparación del benzoatotriol **34**.

2.2.1.6.2. Preparación del benzoatodimetilacetal **37**

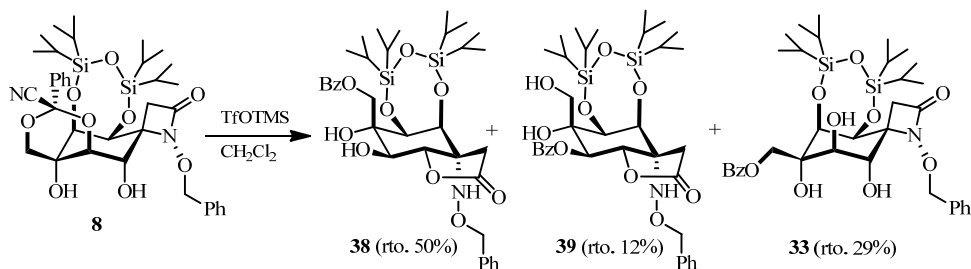
Cuando se intenta proteger la porción 1,3 diol del cianobenciliden acetal **8** con 2,2 dimetoxipropano en presencia de *p*-TsOH en acetona se obtiene, además del producto de protección esperado, el benzoatodimetilacetal **37** (rto. 24%), los benzoatotrioles **33** (rto. 29%) y **34** (rto. 23%). (Esquema 2.2.1.6.2.1).



Esquema 2.2.1.6.2.1. Preparación del benzoatodimetilacetal **37** y los benzoatotrioles **33** y **34**.

2.2.1.6.3. Preparación de la benzoatolactona **38**

El tratamiento del cianobenciliden acetal **8** con TMSOTf en diclorometano condujo tras un día de reacción, a las benzoatolactona regioisómeras **38** (50%) y **39** (12%) y al anteriormente descrito benzoatotriol **33** (29%) (Esquema 2.2.1.6.3.1).

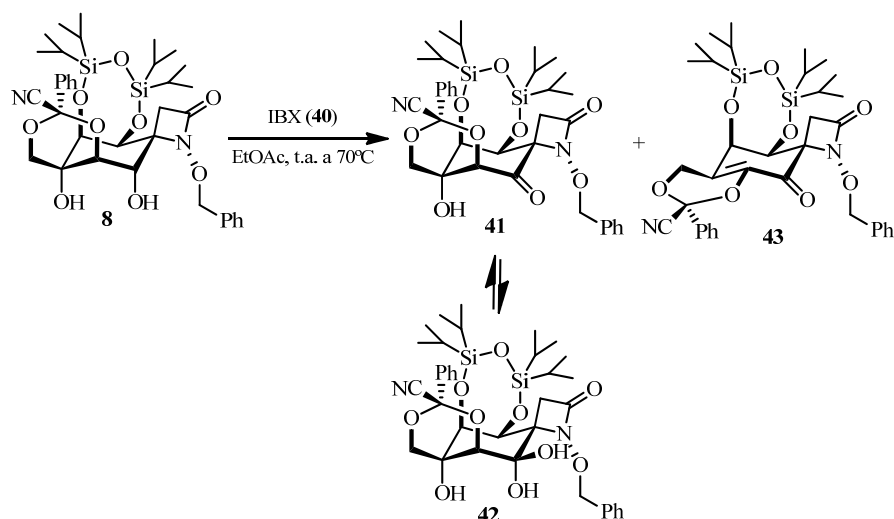


Esquema 2.2.1.6.3.1. Preparación de las benzoatolactonas **38** y **39** y del benzoatotriol **33**.

2.2.1.6.4. Preparación de la cianobencilidenona acetal **41** y su hidrato **42**

La reacción del cianobenciliden acetal **8** y el 1-hidroxi-1,2-benciodoxol-3(1*H*)-ona 1-óxido (IBX, **40**) en acetato de etilo condujo, tras purificación cromatográfica, a una mezcla [10:1] de la cianobencilidenona **41** y su correspondiente hidrato **42**, con un rendimiento del 90%. Como producto minoritario el producto se obtiene el producto de eliminación **43**. (Esquema 2.2.1.6.4.1).⁹⁰

⁹⁰ (a) Al llevar a cabo la oxidación con el reactivo de Dess-Martin se obtiene un 55% de una mezcla [4:1] de la cetona y el hidrato y un 10% del eliminado **43**. (b) Al llevar a cabo la oxidación del cianobenciliden acetal **8** con PCC sólo se observa la formación del producto eliminado **43** (9%) mientras que al realizar la oxidación del sililoxibenzoato **35** con PCC condujo a la correspondiente cetona **44** y a la cetona α - β insaturada **45**. Ver *Parte Experimental*. (c) La reacción del cianobenciliden acetal **8** con DABCO conduce al producto de eliminación **43** (10%) mientras que el tratamiento de **44** con DABCO dio lugar a la lactona **44a**, producto de reordenamiento de la β -lactama, y a *epi*-**44**. Ver *Parte Experimental*.



Esquema 2.2.1.6.4.1. Preparación de la cianobencilidenona **41**.

La asignación estructural de la cianobencilidenona **41** y de su hidrato **42** se realizó en base a distintos espectros de ^1H -RMN en los que la relación de mezcla entre la cetona y el hidrato es variable (Figura 2.2.1.6.4.1).⁹¹

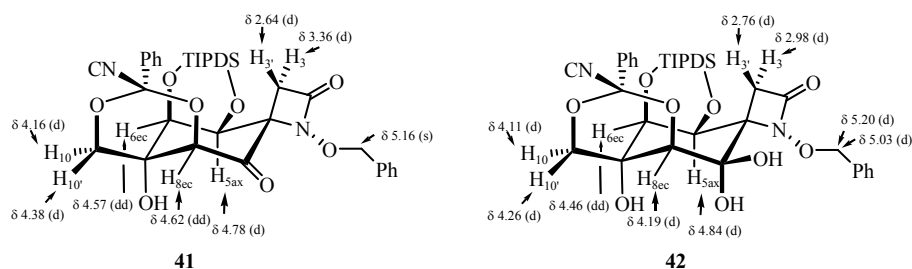


Figura 2.2.1.6.4.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN de la cianobencilidenona **41** y de su hidrato **42**.

⁹¹ El estudio conformacional de la cianobencilidenona **41** y de su hidrato **42** no se ha podido realizar debido a la imposibilidad de asignar las correlaciones HSQC, HMBC, COSY y NOESY correspondientes a cada uno. Asumimos que, tanto la cianobencilidenona **41** como de su hidrato **42**, presentan una conformación mayoritaria en disolución tipo silla 4C_7 , ya que el cianobenciliden acetil **8** (antecesor sintético) como el alquenciléster **3** y el nitroalcohol **2** (predecesores sintéticos), presentan una conformación mayoritaria en disolución tipo silla 4C_7 .

De los distintos espectros de ^1H -RMN, las señales asignadas a la cetona **41** fueron las siguientes: La señal que integra para dos protones y que aparece como un singlete a 5.16 ppm se asignó a los protones metilénicos del bencilo. Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 4.78 ppm ($J = 3.7$ Hz), un doblete a 4.62 ppm ($J = 1.4$ Hz) y un doblete de dobletes a 4.57 ppm ($J = 3.7$ y 1.4 Hz) se asignaron respectivamente, a los protones H-5, H-8 y H-6 del anillo de ciclohexano, destacando la ausencia del protón H-9 del producto de partida cuyo desplazamiento era 4.32 ppm y de apariencia triplete. Los dobletes situados a 4.38 y 4.16 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.1 Hz, fueron asignados al sistema *AB* constituido por los protones del metileno C-10. Finalmente, el sistema *AB* formado por los protones β -lactámicos se muestra como dos dobletes aparentes ($J_{AB} = 13.8$ Hz) centrados a 3.36 ppm (H-3) y 2.64 ppm (H-3').

De los distintos espectros de ^1H -RMN, las señales asignadas al hidrato **42** fueron las siguientes: Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como dobletes a 5.20 ppm ($J = 10.6$ Hz) y a 5.03 ppm ($J = 10.6$ Hz) se asignó al sistema *AB* formado por los protones metilénicos del bencilo. Las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como un doblete a 4.84 ppm ($J = 3.5$ Hz), un doblete de dobletes a 4.46 ppm ($J = 3.5$ y 1.3 Hz) y un doblete a 4.19 ppm ($J = 1.3$ Hz) se asignaron respectivamente, a los protones H-5, H-6 y H-8 del anillo de ciclohexano. La señal que se observa como un singlete ancho a 4.54 ppm y que integra para un protón, se asignó a uno de los OH que se encuentra sobre C-9. Los dobletes situados a 4.26 y 4.11 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.3 Hz, se asignaron al sistema *AB* formado por los protones del metilo C-10. El sistema *AB* formado por los protones β -lactámicos se muestra como dos dobletes aparentes ($J_{AB} = 13.9$ Hz) centrados a 2.98 ppm (H-3) y 2.76 ppm (H-3').

Del espectro de ^{13}C -RMN realizado a la mezcla de cianobencilidenona **41** y de su hidrato **42**, es destacable la señal localizada a 198.5 ppm atribuida al carbono carbonílico C-9.

El espectro de masas *LRMS* (*API-ES*⁺) presenta los picos *m/z* 754 ($\text{M}+2\text{Na}$, **41**)⁺, 731 ($\text{M}+\text{Na}$, **41**)⁺ y 708 (M^+ , **41**) asignados a la cetona y 726 (M^+ , **42**), 728 ($\text{M}+2\text{H}$, **42**)⁺ asignados al hidrato.

Se propone que formación del producto minoritario **43** se produce a partir de la cetona **41** mediante una *sin* eliminación favorecida tras el cambio conformacional de ciclo del cianofenilacetal.

La asignación estructural del eliminado **43** se realizó se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.1.6.4.2).

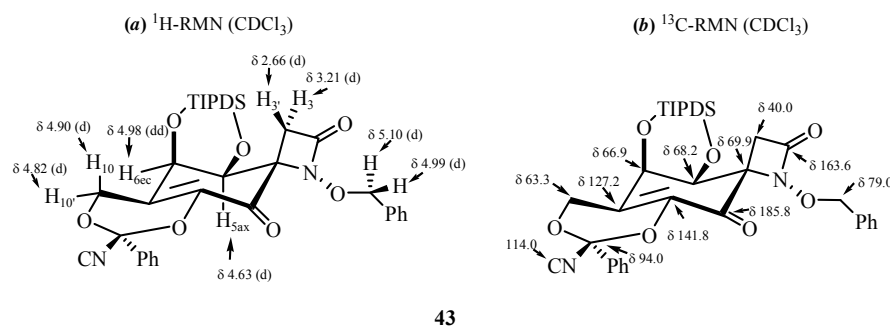


Figura 2.2.1.6.4.2. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del eliminado **43**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que aparecen como dobletes a 4.98 ppm ($J = 4.3$ Hz) y a 4.63 ppm ($J = 4.3$ Hz) se asignaron a los respectivos protones ciclohexénicos H-6 y H-5. Los protones metilénicos del ciclo de cianofenilacetal constituyen un sistema *AB* que se muestra como dos dobletes centrados a 4.90 ppm y 4.82 ppm, con una constante geminal de 17.7 Hz. Los protones metilénicos de la β-lactama constituyen, también, un sistema *AB* que se

muestra como dos dobletes centrados a 3.21 ppm (H-3') y 2.64 ppm (H-3), con una constante geminal de 13.3 Hz.

En el espectro de ^{13}C -RMN, la señal localizada a 185.8 ppm pertenece al nuevo carbono carbonílico (C-9). Las señales localizadas a 141.8 y 127.2 ppm se asignaron a los carbonos C-8 y C-7 del doble enlace formado. Los carbonos cuaternarios correspondientes al grupo ciano y al carbono C-1' se mantienen a 114.0 y 94.0 ppm, respectivamente.

En el espectro de IR, la banda de tensión N-C=O característica de las β -lactamas se encuentra a 1786 cm^{-1} , a 2273 cm^{-1} la banda característica de tensión del enlace CN y a 1661 cm^{-1} la banda característica de tensión del enlace C=O.

Por último, el espectro de masas *LRMS (API-ES⁺)* presenta los picos m/z 1403 (2M+Na)⁺, 713 (M+Na), 691 (M+H)⁺.

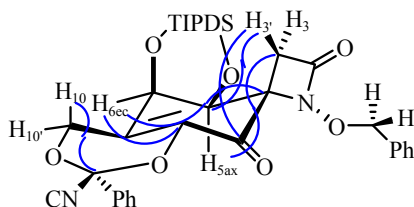


Figura 2.2.1.6.4.3. Correlaciones HMBC (en color azul) más significativos del eliminado **43**.

Mediante el análisis de los experimentos NOESY y HMBC se determinó la conformación mayoritaria del eliminado **43**. (Figura 2.2.1.6.4.3).

El ciclohexeno constituido de los carbonos C-4 a C-9 presenta una conformación mayoritaria tipo semillilla 4H_5 . Esta conformación se deduce del experimento HMBC realizado en el que se observan las correlaciones a tres enlaces entre H-5 y C-3, H-6 y C-4 por un lado y H-6 y C-8 por otro.

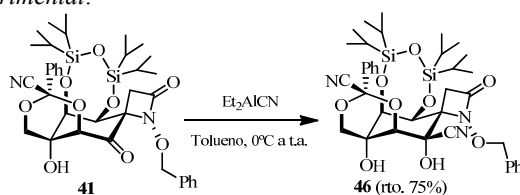
Destacaremos la correlación a tres enlaces entre H-3' y C-5 por encontrarse *anti* entre sí y H-3' y C-9 por encontrarse *sin*. No hemos podido determinar la conformación mayoritaria del ciclohexano constituido por el cianofenilacetal.

La configuración del N alílico, N-1, es *R** deducible de los NOEs que presentan los protones H-10 y H-10' con el protón H-3 y la ausencia de NOEs con el protón H-3' en el eliminado **43**.

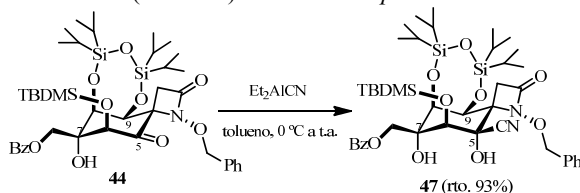
2.2.2. Preparación del nitroalcohol 2. Subruta A1

La reacción de la cianobencilidenona **41**, nitrometano y DBU en CH₂Cl₂ conduce,⁹² tras purificación cromatográfica, al nitroalcohol **2** como un sólido blanco con un rendimiento del 46% y al eliminado **43** con un rendimiento del 10% (Esquema 2.2.2.1).⁹³

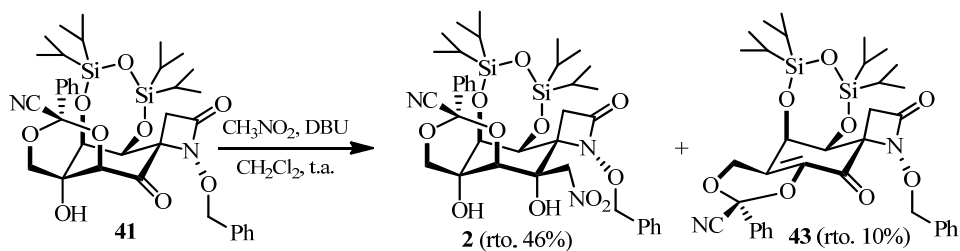
⁹² La reacción de la cianobencilidenona **41** y el cianuro de dietil aluminio en tolueno condujo tras 14 horas de reacción a la cianhidrina **46** como un sólido blanco con un rendimiento del 75%. Ver *Parte Experimental*.



Cuando se utilizan las mismas condiciones de reacción con el cetona **44** se obtiene la correspondiente cianhidrina **47** (rto. 93%). Ver *Parte Experimental*.



⁹³ Revisión de la reacción de Henry, ver: (a) Rosini, G. en *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M.; Fleming, I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; vol.2, p 321-340. (b) Luzzio, F.A. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 915-945. (c) Fair, V. Sinhababu, A. K.; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1893-1897. (d) Uso catalítico de bases no iónicas en la reacción de nitroalcanos con compuestos carbonílicos, ver: Kisanga, P.B.; Verkade, J. G. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 4298-



Esquema 2.2.2.1. Preparación del nitroalcohol 2.

La asignación estructural del nitroalcohol 2 se realizó en base a los datos espectroscópicos (Figura 2.2.2.1).⁹⁴

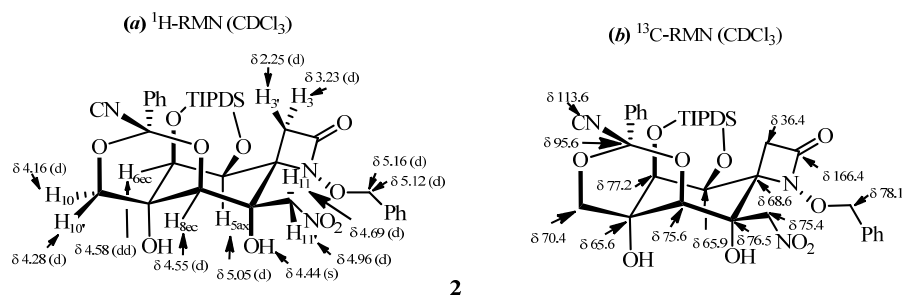


Figura 2.2.2.1. Selección de datos espectroscópicos de $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ del nitroalcohol 2.

En el espectro de $^1\text{H-RMN}$, las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como doblete a 5.05 ppm ($J = 3.8$ Hz), un doblete de dobletes a 4.58 ppm ($J = 3.8, 1.4$ ppm) y un doblete a 4.55 ppm ($J = 1.4$ Hz), se asignaron a los protones H-5, H-6 y H-8 del anillo de ciclohexano. Los dobletes

4303. (e) Reacción nitroaldólica llevada a cabo en líquidos iónicos, ver: Jiang, T.; Gao, H.; Han, B.; Zhao, G.; Chang, Y.; Wu, W.; Gao, L.; Yang, G. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2933-2791. (f) Adición de nitrometano a cicloalcanonas catalizada por TMG (tetrametilguanidina), ver: Simoni, D.; Invidiata, F. P.; Manfredini, S.; Ferroni, R.; Lampronti, I.; Roberti, M.; Pollini, G.P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2749, 2752. (g) Aplicación de nitroalcoholes en síntesis estereoselectiva de aminoalcoholes, ver: Liu, F. W.; Zang, J. Y.; Liu, H. M. *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 332-338.

⁹⁴ La asignación estructural conllevó experimentos bidimensionales COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

situados a 4.96 y 4.69 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 11.7 Hz, fueron asignados al nuevo sistema *AB* constituido por los protones del nitrometano incorporado. El singlete situado a 4.44 ppm, se adjudicó al hidroxilo que se encuentra sobre C-9. Finalmente, se observan dos sistemas *AB*, uno formado por los protones del metileno C-10 (aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 12.1$ Hz, centrados a 4.28 ppm y 4.16 ppm) y otro formado por los protones β -lactámicos (aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 15.2$ Hz, centrados a 3.23 ppm y 2.25 ppm).

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observan dos señales localizadas a 76.5 ppm y a 75.4 ppm atribuidas, respectivamente, al carbono C-9 del ciclohexano y al nuevo carbono del nitrometano introducido C-11. La señal situada a 113.6 ppm se asignó al carbono del grupo ciano. El resto de los carbonos del anillo 1,3-dioxano aparecen a los desplazamientos habituales⁹⁵ (a 95.6 C-1', a 70.4 ppm C-10, a 65.6 ppm C-7 y a 75.6 ppm C-8). El resto de los carbonos del anillo de ciclohexeno y de la β -lactama aparecen a los desplazamientos habituales (a 68.6 ppm C-4, a 65.9 ppm C-5 y a 77.2 ppm C-6, a 166.4 ppm C-2 y a 36.4 ppm C-3).

En el espectro de IR, las nuevas bandas de absorción observada a 1561 y a 1382 cm^{-1} son asignadas a la vibración de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-NO₂. La banda de tensión N-C=O característica de la β -lactama se encuentra a 1768 cm^{-1} , la banda de tensión del enlace CN aparece a 2215 cm^{-1} y la banda de tensión de los grupos hidroxilo aparece a 3429 cm^{-1} . Pero no se observa la banda característica de tensión del enlace C=O.

En el espectro de LRMS (*API-ES*⁺) se aprecian los picos m/z 770 (*M*)⁺, 771 (*M*+H)⁺ y 793 (*M*+Na)⁺ así como los picos m/z 743 (*M*-26)⁺ asignado a la pérdida de cianuro y 691 (*M*-Ph) asignado a la pérdida de fenilo.

⁹⁵ En comparación con los desplazamientos químicos del cianobenciliden acetal **8**.

Para determinar la configuración relativa del nuevo centro estereogénico formado (C-9) y la conformación mayoritaria en disolución del nitrocompuesto **2** se llevó a cabo el análisis de las constantes de acoplamiento, experimentos NOE y un estudio de correlaciones HMBC (Figura 2.2.2.2).

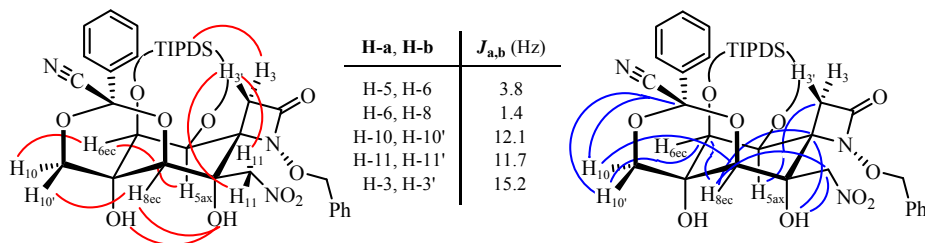


Figura 2.2.2.2. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones NOEs (color rojo) y HMBC (color azul) más significativos del nitroalcohol **2**.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del nitroalcohol **2** es la de una silla 4C_7 (Figura 2.2.2.2), tal como se deduce de la constante de acoplamiento a larga distancia entre los protones H-6 y H-8 ($J_w = 1.4$ Hz, también observado en el COSY), así como, de la presencia de NOE entre H-10 y H-6ec, y entre H-10' y H-8ec.⁹⁶

El nuevo centro estereogénico generado en C-9, presenta una conformación R^* , en la que el nitrometileno ocupa una posición ecuatorial y el hidroxilo axial. Esta conformación se deduce de la existencia de NOE entre los protones metilénicos (H-11 y H-11') del sustituyente nitrometileno y el protón H-3' de la β -lactama. Mientras que el protón H-3 da NOE con los protones del grupo TIPDS.

⁹⁶ Además, el experimento HMBC corrobora esta asignación observándose correlaciones a tres enlaces del protón H-8ec con el carbono C-4, del protón H-5ax con el metileno β -lactámico pseudoaxial C-3, del protón H-10 con el carbono C-8 y del protón H-10' con el carbono C-6.

En el espectro ^1H -RMN, el singlete (a 4.44 ppm) se asignó al protón del hidroxilo que soporta el carbono C-9. Es importante indicar que existen correlaciones a tres enlaces, HMBC, con los carbonos C-11 y C-4, dichas correlaciones indican una disposición relativa *sin* y *anti* de los correspondientes enlaces, respectivamente. Estas asignaciones estructurales se corroboran con la presencia de un NOE intenso entre H-3' y H-11' y uno leve entre H-3' y H-11(Figura 2.2.2.2). Estos datos experimentales sugieren una restricción conformacional del enlace C(9)-C(11) debido a la presencia de un red de enlace de hidrógeno cooperativos entre C(8)-OH, C(9)-OH y el grupo NO_2 (Figura 2.2.2.3). Además, proponemos el establecimiento de una tercera interacción estabilizante intramolecular entre el nitrógeno del grupo nitro y el oxígeno del resto *N*-benciloxi.

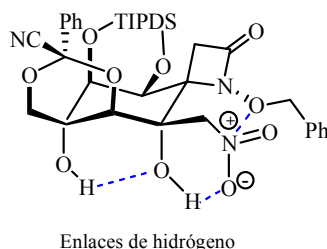
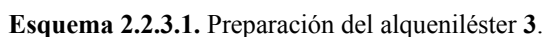


Figura 2.2.2.3. Red de enlaces de hidrógeno intramolecular propuesta para el nitroalcohol **2**.

El nitroalcohol 2 es un análogo de rac-TTX (rac-1), ya que incorpora diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos del esqueleto carbonado de rac-TTX (rac-1) y además, presentan la disposición estereoquímica correcta en los carbonos C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a. Además, es preparado en tan sólo 11 etapas, con un rendimiento global (no optimizado) del 4.5% a partir de productos comerciales asequibles y baratos.

La reacción de la cianobencilidenona **41** y el 2-(trifenil- λ^5 -fosfaniliden)acetato de metilo ⁹⁷ en tolueno a temperatura ambiente, conduce tras purificación cromatográfica, al alqueniléster **3** como un sólido blanco con un rendimiento del 99%. (Figura 2.2.3.1).



(Figura 2.2.3.1).⁹⁸



Figura 2.2.3.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del alqueniléster **3**.

⁹⁸ La asignación de las señales de RMN del éster **3** está apoyada por los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y COSY.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como doblete a 6.25 ppm ($J = 1.4$ Hz), otro doblete a 4.68 ppm ($J = 3.7, 1.4$ ppm) y un doblete de dobletes a 4.48 ppm ($J = 1.4$ Hz), se asignaron a los protones H-8, H-5 y H-6 del anillo de ciclohexano. Los dobletes situados a 4.32 y 4.21 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.0 Hz, fueron asignados a los protones del metileno C-10. Los singletes situados a 6.56, 3.77 y 2.98 ppm, que integran para un protón, tres protones, y un protón, respectivamente, se adjudicaron al protón H-11, a los protones metilénicos del éster incorporado sobre C-9 y al protón del hidroxilo ubicado sobre C-7, respectivamente. Finalmente, el sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 13.7$ Hz, centrados a 3.37 ppm y 2.63 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN, dos señales localizadas a 147.2 ppm y a 123.9 ppm atribuidas, respectivamente, al carbono C-9 del ciclohexano y al nuevo carbono introducido C-11. La señal situada a 114.6 ppm se asignó al carbono del grupo ciano. El resto de los carbonos del anillo 1,3-dioxano aparecen a 95.1 C-1', 71.4 ppm C-10, a 77.2 ppm C-7 y a 73.3 ppm C-8. El resto de los carbonos del anillo de ciclohexeno y de la β -lactama aparecen a los desplazamientos habituales (a 65.6 ppm C-4, a 69.7 ppm C-5, a 76.4 ppm C-6, a 163.5 C-2 y a 41.6 C-3).

En el espectro de IR, las bandas de absorción observadas a 1726 y a 1658 cm^{-1} son debidas a la vibración de tensión del carbonilo del éster. La banda de tensión N-C=O característica de la β -lactama se encuentra a 1752 cm^{-1} , la banda de tensión del enlace CN aparece a 2247 cm^{-1} y la banda de tensión de los grupos hidroxilo aparece a 3400 cm^{-1} .

El espectro de *LRMS* (*API-ES*⁺) se aprecian los picos m/z 1552 ($2\text{M}+\text{H}+\text{Na}$)⁺ y 740 ($\text{M}+2\text{Na}+\text{H}$)⁺ así como el pico m/z 738 ($\text{M}-26$)⁺ asignado a la pérdida de cianuro.

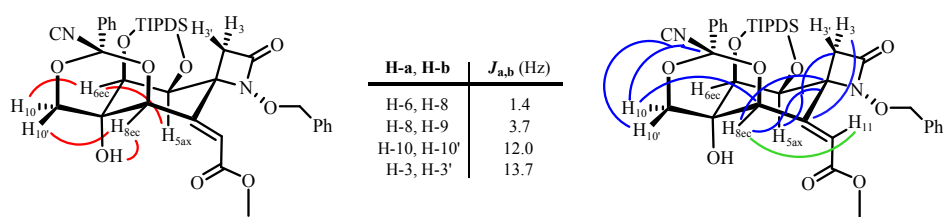


Figura 2.2.3.2. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones NOEs (en color rojo), HMBC (en color azul) y COSY (en color verde) más significativos del alqueniléster **3**.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del ester **3**, independientemente de la configuración de doble enlace, es la de una silla 4C_7 (Figura 2.2.3.2), tal como se deduce de la constante de acoplamiento a larga distancia entre los protones H-6 y H-8 ($J_w = 1.4$ Hz, también observado en el COSY), así como, de la presencia de NOE entre H-10 y H-6ec, y entre H-10' y H-8ec.⁹⁹

El estudio cristalográfico de difracción de rayos X¹⁰⁰ del alqueniléster **3** nos permite determinar inequívocamente que la configuración del doble enlace generado en la reacción es *Z* y confirmar su estructura y las configuraciones relativas de sus centros estereogénicos: 1'*R**, 1*R*_N*, 4*S**, 5*S**, 6*S**, 7*S** y 8*R**.

⁹⁹ Además el experimento HMBC corrobora esta asignación observándose correlaciones a tres enlaces del protón H-8ec y H-6ec con el carbono C-4, del protón H-5ax con el metileno β-lactámico pseudoaxial C-3, del protón H-3' con el carbono C-5 y del protón H-3 con el carbono C-9. Además H-8 da correlación a tres enlaces con los carbonos C-1', C-9 y C-11.

¹⁰⁰ La resolución de la estructura **3** de difracción de rayos X fue realizada por el Instituto Catalán de Investigación Química empleando en un difractómetro *Bruker-Nonius* equipado con un detector de área *APPEX-2 4K CCD*.

En la Figura 2.2.3.3 se muestra la numeración de los átomos¹⁰¹ y una representación de la molécula teniendo en cuenta los valores obtenidos de las coordenadas atómicas.¹⁰²

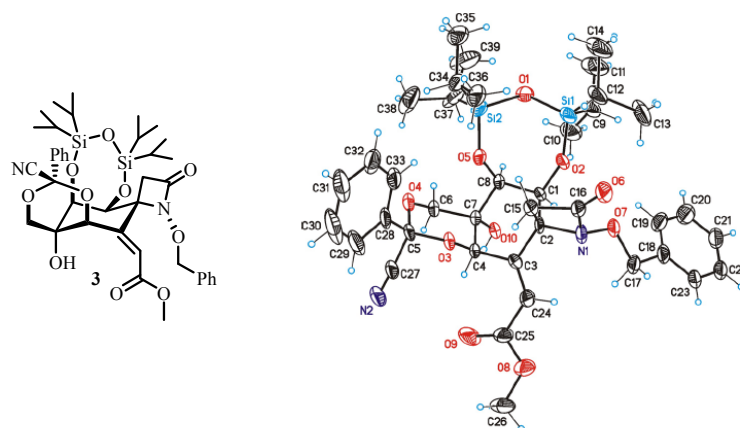


Figura 2.2.3.3. Representación de la estructura molecular del éster **3** obtenida por difracción de rayos X.

La configuración relativa del doble enlace, *Z*, se deduce de los ángulos de torsión C2-C3-C24-25 y C4-C3-C24-C25 que tiene valores de 171.5(6)° y -3.3(9)°, respectivamente.

La configuración relativa del centro estereogénico N-1, *R**, se deduce de los ángulos de torsión 07-N1-C2-C15, 07-N1-C2-C1, 07-N1-C2-C3, 07-N1-C16-C15 y 07-N1-C16-O6 que tienen valores de -141.3(4)°, -26.6(6)°, 103.4(5)°, 142.4(4)° y -34.1(11)° respectivamente.

¹⁰¹ En la discusión de los datos cristalográficos del alqueniléster **3**, se empleará la misma numeración de átomos que la fijada al obtener la estructura de rayos X (ver Figura 2.2.3.3.), excepto a la hora de definir su conformación mayoritaria, momento en el que se usará la numeración establecida en el apartado de *Nomenclatura*.

¹⁰² Las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión del alqueniléster **3** se resumen en las tablas A.20, A.21 y A.22, respectivamente, del *Anexo A* de la presente Memoria.

En estado sólido, al igual que en disolución, el anillo de ciclohexano presenta una conformación de tipo silla 4C_7 con el grupo hidroxilo O10-H sobre C7 en disposición axial y el hidrógeno sobre C4 en ecuatorial. Por otro lado, el anillo de seis miembros constituido por el 1,3-dioxano presenta una conformación mayoritaria 7C_1 , (el ángulo de torsión O3-C5-O4-C6 tiene un valor de $53.1(6)^\circ$) en la que el grupo ciano (C27N2) sobre C5 se encuentra en disposición ecuatorial (el ángulo de torsión C4-O3-C5-C27 tiene un valor de $94.9(5)^\circ$) y el fenilo axial (el ángulo de torsión C-4-O3-C5-C28 tiene un valor de $-174.4(3)^\circ$). Por último, el anillo de siete miembros formado por O y Si presenta una conformación tipo bote ${}^{O(2), Si-O(5)}B$, siendo el ángulo de torsión O2-C1-C8-O5 de $49.4(6)^\circ$ y el anillo de β -lactama presenta una conformación casi plana (el ángulo de torsión N1-C2-C15-C16 es de $14.0(4)^\circ$).

Por otro lado, la difracción de rayos X de un cristal del alqueniléster **3** nos permite confirmar inequívocamente su estructura.

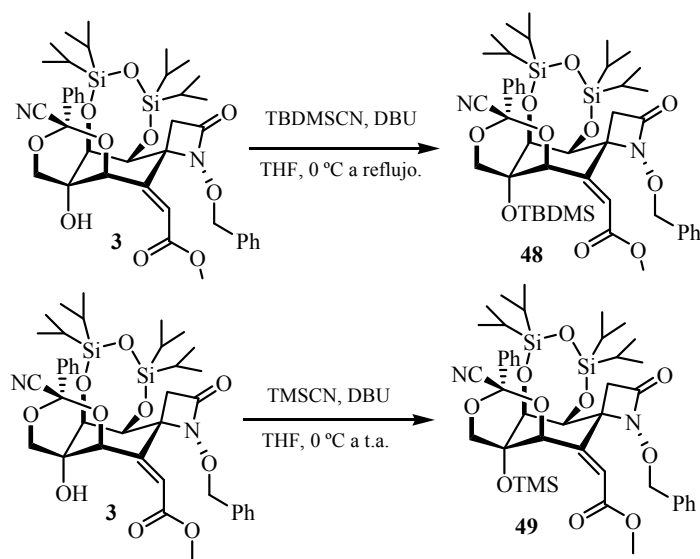
*El alqueniléster **3** es un análogo avanzados en la síntesis de rac-TTX (rac-1), ya que incorpora diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos del esqueleto carbonado de rac-TTX (rac-1) y además, presentan la disposición estereoquímica correcta en los carbonos C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a.*

*En tan sólo 11 etapas, se ha generado el alqueniléster **3**, análogo de rac-TTX (rac-1), con un rendimiento global del 9.34%.*

2.2.3.1. Protección del hidroxili terciario del alqueniléster **3**

La reacción del alqueniléster **3** y los cianuros de *terc*-butildimetilsililo (TBDMSCN) o trimetilsililo (TMSCN) en presencia de DBU utilizando THF como disolvente, dio lugar tras su aislamiento y purificación cromatográfica, a la formación de los correspondientes sililéter terciarios **48** y **49** como sólidos

blancos con rendimientos del 70 % y un 32%, respectivamente (recuperándose un 56% del sustrato de partida) (Esquema 2.2.3.1.1).

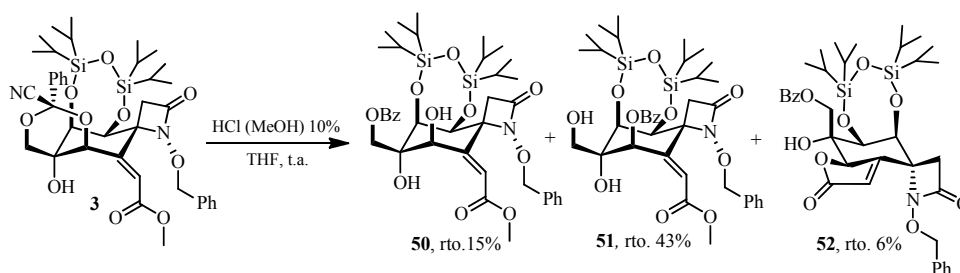


Esquema 2.2.3.1.1. Reacción de protección del hidroxilo terciario del alqueniléster **3**.

2.2.3.2. Preparación de los benzoatos **50**, **51** y **52**

La desprotección del alqueniléster **3** se llevó a cabo mediante el tratamiento con una disolución de ácido clorhídrico al 10% en metanol. Tras un día a temperatura ambiente y posterior purificación cromatográfica, dio lugar a los benzoatos **50** y **51** como sólidos blancos, y a la lactona **52** como un aceite, con unos rendimientos de 15, 43 y 6%, respectivamente (Esquema 2.2.3.2.1).

Otros métodos de obtención de los benzoatos **50** y **51** fueron: i) el tratamiento del alqueniléster **3** con TMSOTf en diclorometano conduciendo a 4% de **50**, 34% de **51** y 50% de **52**; ii) Pd/C y sílica gel en MeOH conduciendo a 30% de **50** y 40% de **51** y iii) OsO₄ y NMO en acetona-H₂O conduciendo a 11% de **50** y 11% de **51**.



Esquema 2.2.3.2.1. Hidrólisis del grupo cianobencilidenacetal del alquénilester **3**.

La asignación estructural del benzoato **50** se realizó en base a sus datos espectroscópicos (Figura 2.2.3.2.1).¹⁰³

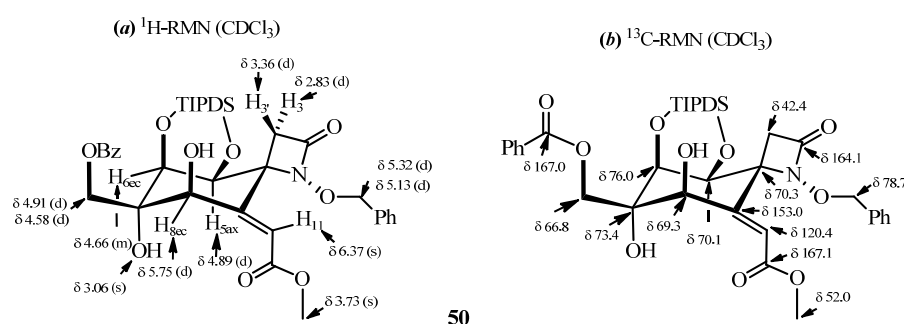


Figura 2.2.3.2.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del benzoato **50**.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como doblete a 5.75 ppm ($J = 10.4$ Hz), doblete a 4.89 ppm ($J = 3.6$ Hz) y un multiplete a 4.66 ppm se asignaron a los protones H-8, H-5 y H-6 del anillo de ciclohexano. Los dobletes situados a 4.91 y 4.58 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 11.5 Hz, fueron asignados a los protones de metileno C-10. El doblete situado a 4.03 ppm ($J = 10.4$ ppm) y el singlete situado

¹⁰³ La asignación de las señales de RMN del benzoato **50** está apoyada por los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y COSY.

a 3.03 ppm, que integran para un protón cada uno, se asignaron a los protones hidroxílicos situados sobre los carbonos C-8 y C-7, respectivamente. Los singletes situados a 6.37 ppm y 3.73 ppm, que integran para un protón y tres protones, respectivamente, se adjudicaron al protón ubicado sobre C-11 y a los protones metilénicos del éster incorporado sobre C-9. Finalmente, el sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos (aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 13.7$ Hz, centrados a 3.36 ppm y 2.83 ppm).

En el espectro de ^{13}C -RMN, la señal localizada a 167.0 ppm se atribuyó al carbono carbonílico del grupo benzoato.

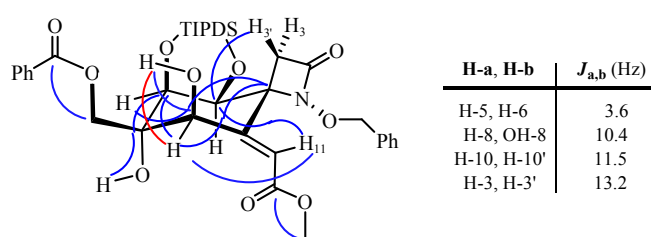


Figura 2.2.3.2.2. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones NOEs (en color rojo) y HMBC (en color azul) más significativos del benzoato **50**.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del benzoato **50** es la de una silla 4C_7 deducible de las correlaciones observadas a tres enlaces en HMBC para el protón H-8ec con los carbonos C-4 y C-6 y el protón H-6ec con el carbono C-4 (Figura 2.2.3.2.2).

La asignación estructural del benzoato **51** se realizó en base a los datos espectroscópicos (Figura 2.2.3.2.3).¹⁰⁴

¹⁰⁴ La asignación de las señales de RMN del benzoato **51** está apoyada por los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y COSY.

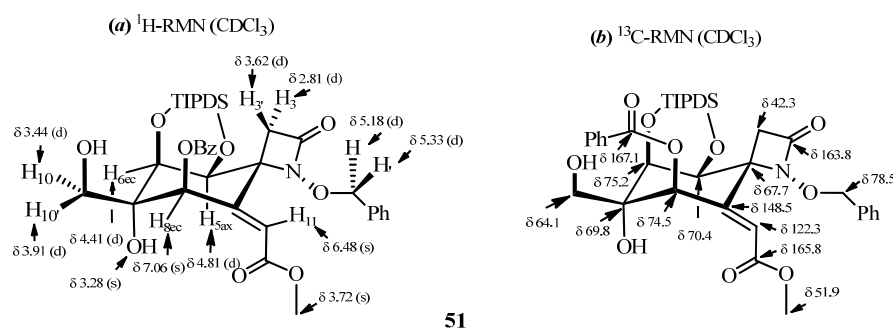


Figura 2.2.3.2.3. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del benzoato **51**.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del benzoato **51** es la de una silla 4C_7 (Figura 2.2.3.2.4).

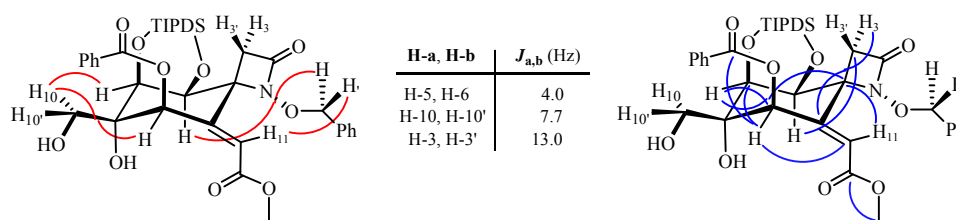


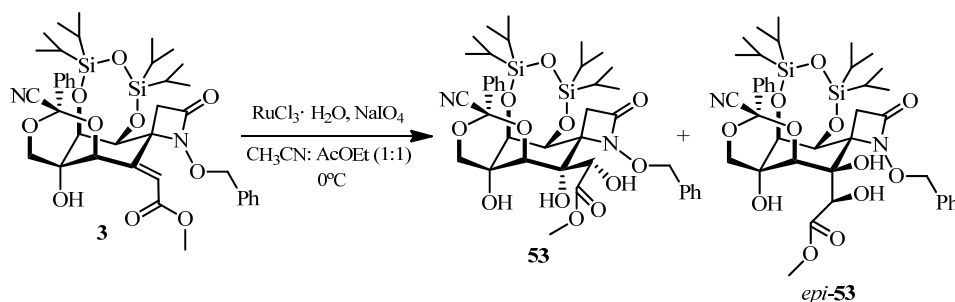
Figura 2.2.3.2.4. Selección de constantes de acoplamiento, correlaciones NOEs (en color rojo) y HMBC (en color azul) más significativos del benzoato **51**.

2.2.4. Síntesis del α -cetoéster **4**

2.2.4.1. Preparación del diol **53** y *epi*-**53**

La dihidroxilación del alquenciléster **3** se llevó a cabo con tricloruro de rutenio hidratado y peryodato sódico a 0°C . Tras 20 minutos de reacción, posterior tratamiento con tiosulfato sódico y purificación en columna

cromatográfica, condujo a una mezcla 2:1 de los correspondientes dioles **53** y *epi*-**53**, sólidos con un rendimiento del 34% (Esquema 2.2.4.1.1).



Esquema 2.1.4.1.1. Preparación de los dioles **53** y *epi*-**53**.

Las asignaciones estructurales de los dioles **53** y *epi*-**53** se realizaron en base a los datos espectroscópicos (Figura 2.2.4.1.1 y Figura 2.2.4.1.2).¹⁰⁵

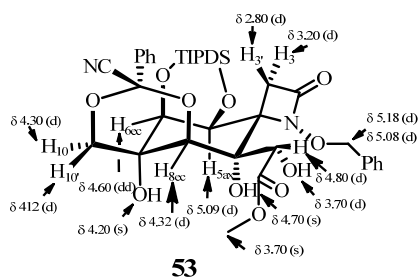


Figura 2.2.4.1.1. Selección de datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de ¹H-RMN del diol **53**.

En el espectro de ¹H-RMN, las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como dos dobletes a 4.80 y a 3.70 ppm ($J = 5.5$ Hz), se asignaron a los protones H-11 y OH-11. Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 5.09 ppm ($J = 3.9$ Hz), un doblete de

¹⁰⁵ Se asignó inequívocamente el diol *epi*-**53** porque se obtuvo puro tras realizar la oxidación de la mezcla de los dos dioles. Ver *Parte Experimental*: preparación de α -cetoéster **4**.

dobletes a 4.60 ppm ($J = 3.9, 1.4$ Hz) y otro doblete a 4.32 ppm ($J = 1.4$ Hz), se asignaron a los protones ciclohexánicos H-5, H-6 y H-8 respectivamente. Los dobletes situados a 4.30 y 4.12 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.0 Hz, fueron asignados a los protones de metileno C-10. Los singletes situados a 3.70 y 4.20 ppm, que integran para tres protones y un protón, respectivamente, se adjudicaron a los protones metilénicos del éster ubicado sobre C-11 y al protón del hidroxilo ubicado sobre C-7. El sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 14.8$ Hz, centrados a 3.20 ppm y 2.80 ppm.

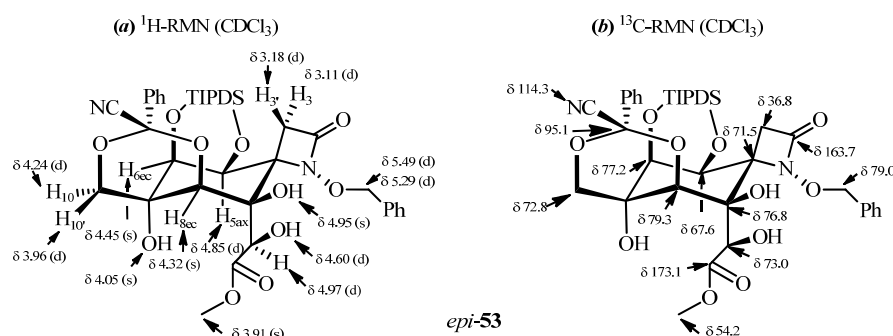


Figura 2.2.4.1.2. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del diol *epi*-53.

En el espectro de ^1H -RMN, las señales que integran cada una para un protón y que aparecen como dos dobletes a 4.97 y a 4.60 ppm ($J = 4.3$ Hz), se asignaron a los protones H-11 y OH-11. El singlete que integra para un protón y que aparece a 4.95 ppm se asignó al protón del hidroxilo OH-9. Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 4.85 ppm ($J = 3.8$ Hz), y como dos singletes a 4.45 y 4.32 ppm, se asignaron a los protones ciclohexánicos H-5, H-6 y H-8 respectivamente. Los dobletes situados a 4.96 y 4.24 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.1 Hz, fueron asignados a los protones de metileno C-10. Los singletes situados a 3.91 y 4.05

ppm, que integran para tres protones y un protón, respectivamente, se adjudicaron a los protones metilénicos del éster ubicado sobre C-11 y al protón del hidroxilo ubicado sobre C-7. El sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 13.5$ Hz, centrados a 3.18 ppm y 3.11 ppm.

En el espectro de ^{13}C -RMN, dos señales localizadas a 76.8 ppm y a 73.0 ppm atribuidas, respectivamente, al carbono C-9 del ciclohexano y al carbono C-11. La señal situada a 114.3 ppm se asignó al carbono del grupo ciano. El resto de los carbonos del anillo 1,3-dioxano aparecen a 95.1 ppm C-1', 72.8 ppm C-10, a 64.7 ppm C-7 y a 79.3 ppm C-8. El resto de los carbonos del anillo de ciclohexeno y de la β -lactama aparecen a 71.5 ppm C-4, a 67.6 ppm C-5, a 77.2 ppm C-6, a 163.7 ppm C-2 y a 36.8 ppm C-3.

En el espectro de IR, la nueva banda de absorción observada a 1700 cm^{-1} es debida a la vibración de tensión del carbonilo del éster. La banda de tensión N-C=O característica de la β -lactama se encuentra a 1747 cm^{-1} , la banda de tensión del enlace CN aparece a 2250 cm^{-1} y la banda de tensión de los grupos hidroxilo aparece a 3380 cm^{-1} .

En el espectro de *LRMS* (*API-ES*⁺) se aprecian los picos m/z 822 ($\text{M}+\text{H}+\text{Na}$)⁺, 821 ($\text{M}+\text{H}+\text{Na}$)⁺ 800 ($\text{M}+2\text{H}$)⁺ y 799 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ así como el pico m/z 772 ($\text{M}-26$)⁺ asignado a la pérdida de cianuro.

La conformación mayoritaria en disolución del diol *epi-53* junto a la configuración relativa de los nuevos centros esterogénicos generados C-9 y C-11, fueron determinadas mediante el análisis de las constantes de acoplamiento, experimentos HMBC y NOESY (Figura 2.2.4.1.3).

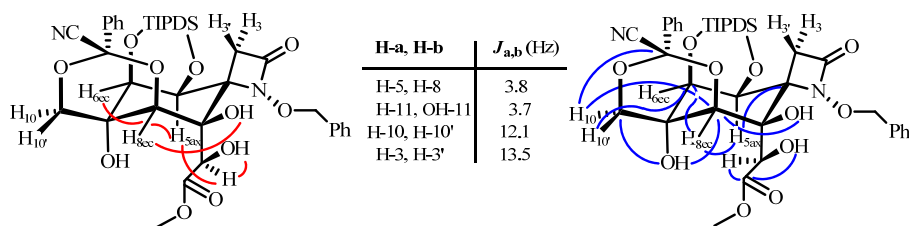


Figura 2.2.4.1.3. Selección de de constantes de acoplamiento, correlaciones NOEs (en color rojo) y HMBC (en color azul) más significativos del diol *epi*-**53**.

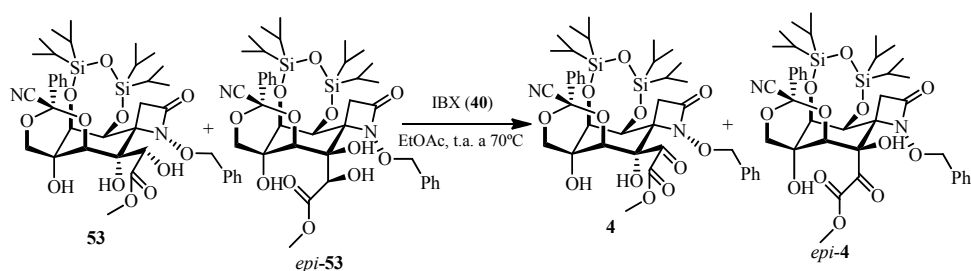
La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del diol **53** es la de una silla 4C_7 , tal como se deduce de la constante de acoplamiento a larga distancia entre los protones H-6 y H-8 ($J_w = 1.4$ Hz).

El diol *epi*-**53** también tiene una conformación mayoritaria para el anillo de ciclohexano tipo silla 4C_7 (Figura 2.2.4.1.3), deducible de las correlaciones observadas a tres enlaces en HMBC para el protón H-8ec con los carbonos C-4 y C-6, así como, de la presencia de NOE entre H-11 y H-5ax, y entre el protón del hidroxilo OH-9 y H-8ec. Según estos datos, en el caso del diol (*epi*-**53**), el hidroxilo terciario introducido en C-9(R^*) ocupa una posición ecuatorial, *sin* al nitrógeno de la β -lactama y al oxígeno del anillo de 1,3-dioxano situado sobre el carbono C-8. Por otro lado, el hidroxilo secundario introducido en C-11 presenta una configuración relativa R^* , deducible de los NOEs observados entre el H-11 y los protones H-5 y OH-11. Por todo lo anterior, podemos establecer que el proceso de dihidroxilación del doble enlace del alqueniléster **3** ha transcurrido de forma *sin*.

2.2.4.2. Preparación de los α -cetoésteres **4** y *epi*-**4**

La reacción de una mezcla 2:1 de los correspondientes dioles **53** y *epi*-**53** y 1-hidroxi-1,2-benciodoxol-3(1*H*)-ona 1-óxido (IBX, **40**) en acetato de etilo

condujo, tras filtración y purificación cromatográfica, a una mezcla 2:1 de los α -cetoésteres **4** y *epi*-**4** con un rendimiento del 45%, recuperándose el diol *epi*-**53** con un rendimiento del 30%. (Esquema 2.2.4.2.1).



Esquema 2.2.4.2.1. Preparación de los α -cetoésteres **4** y *epi*-**4**.

La asignación estructural de los α -cetoésteres **4** y *epi*-**4** se realizó en base a los datos espectroscópicos (Figura 2.2.4.2.1).

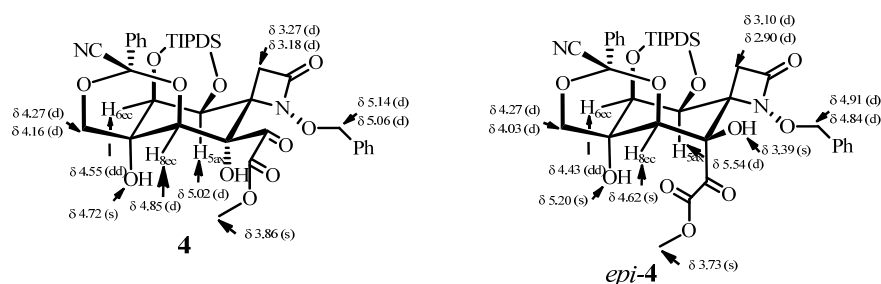


Figura 2.2.4.2.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN de los α -cetoésteres **4** y *epi*-**4**.

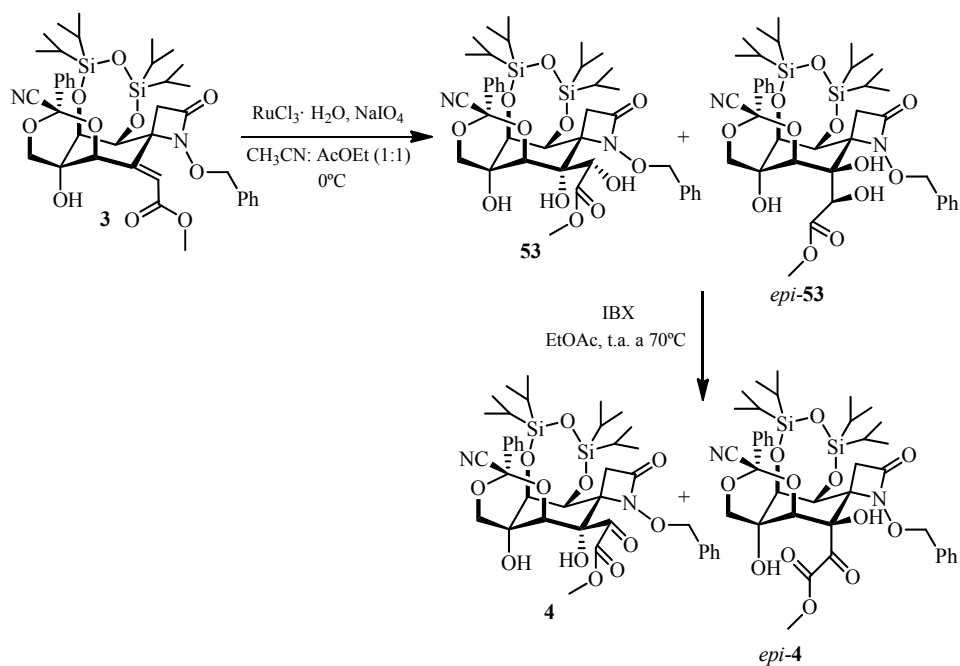
En el espectro de ^1H -RMN, los datos asignados a la α -cetoéster **4** fueron los siguientes. Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 5.02 ppm ($J = 3.7$ Hz), otro doblete a 4.85 ppm ($J = 1.4$ Hz) y un doblete de dobletes a 4.55 ppm ($J = 3.7, 1.4$ Hz), se asignaron a los protones ciclohexánicos H-5, H-8 y H-6, respectivamente. Los dobletes situados a 4.27 y 4.16 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.1 Hz, fueron

asignados a los protones de metileno C-10. Los singletes situados a 3.86 y 4.72 ppm, que integran para tres protones y un protón, respectivamente, se adjudicaron a los protones metilénicos del éster ubicado sobre C-11 y al protón del hidroxilo ubicado sobre C-7. El sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 13.5$ Hz, centrados a 3.27 ppm y 3.18 ppm.

En el espectro de ^1H -RMN, los datos asignados a la cetona *epi-4* fueron los siguientes. El singlete que integra para un protón y que aparece a 3.39 ppm se asignó al protón del hidroxilo OH-9. Las señales que integran para un protón cada una y que aparecen como un doblete a 5.54 ppm ($J = 3.8$ Hz), un singlete ancho a 4.62 ppm y un doblete de dobletes a 4.43 ppm ($J = 3.8, 1.0$ Hz), se asignaron a los protones ciclohexánicos H-5, H-8 y H-6 respectivamente. Los dobletes situados a 4.27 y 4.03 ppm, ambos con una constante de acoplamiento de 12.3 Hz, fueron asignados a los protones del metileno C-10. Los singletes situados a 3.73 y 5.20 ppm, que integran para tres protones y un protón, respectivamente, se adjudicaron a los protones metilénicos del éster ubicado sobre C-11 y al protón del hidroxilo ubicado sobre C-7. El sistema *AB*, formado por los protones β -lactámicos aparecen como dos dobletes, $J_{AB} = 14.1$ Hz, centrados a 3.10 ppm y 2.90 ppm.

En el espectro de *LRMS* (*API-ES*⁺), se aprecian los picos m/z 797 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 819 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ y 1615 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺.

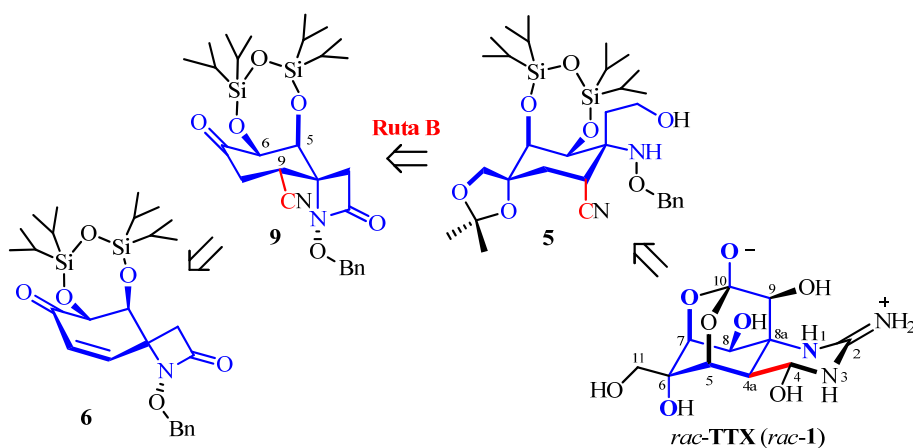
En resumen, los α -cetoésteres 4 y epi-4 se preparan a partir del alqueniléster 3 mediante la secuencia sintética que implica: i) dihidroxilación diastereoselectiva por la cara β y ii) oxidación selectiva del hidroxilo secundario con un rendimiento del 15% (Esquema 2.2.4.2.2).



Esquema 2.2.4.2.2. Esquema sintético de los α -cetoésteres **4** y *epi-4*.

2.3. Ruta B: Preparación del aminoalcohol 5

La Ruta B implica la incorporación del carbono C-4 de *rac*-TTX (*rac*-1) en una etapa temprana de la síntesis. Se eligió el grupo ciano como funcionalidad precursora del grupo hemiaminal presente en la TTX. La preparación de la ciano- β -lactama **9**, se lleva a cabo mediante la adición ($A_{1,4}$) de cianuro, tipo Michael, a la correspondiente ciclohexenona **6** (Esquema 2.3.1).



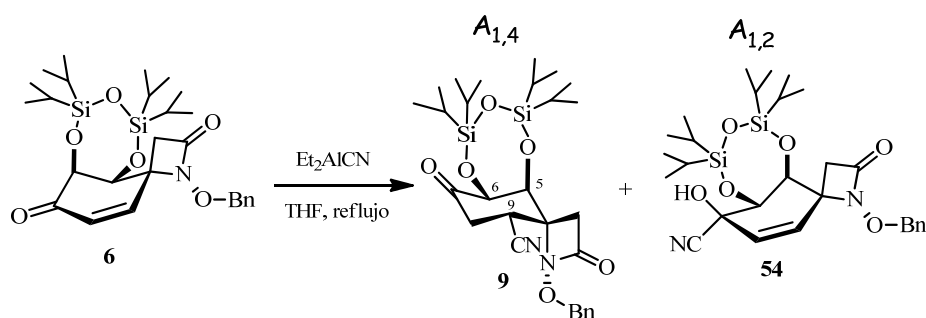
Esquema 2.3.1. Esquema retrosintético de la aminoalcohol **5**, y su relación estructural tanto con *rac*-TTX (*rac*-1) como con la ciclohexenona **6** (en color azul se muestra su esqueleto común, destacando en rojo el nuevo centro incorporado).

2.3.1. Preparación de la ciano- β -lactama **9**

La reacción de la ciclohexenona **6** y el Et_2AlCN en THF a reflujo durante

tres horas,¹⁰⁶ tras posterior aislamiento¹⁰⁷ y purificación en columna cromatográfica dio lugar a la formación de la ciano- β -lactama **9** y la cianhidrina **54**¹⁰⁸ (rto. 67% y 15%, respectivamente), ambas como sólidos blancos.¹⁰⁹

Esta hidrocianación tiene lugar en condiciones de control termodinámico que favorece la formación regioselectiva del aducto 1,4 más estable (ciano- β -lactama **9**).



Esquema 2.3.1.1. Productos de adición de cianuro $A_{1,4}$ (**9**, rto.67%) y $A_{1,2}$ (**54**, rto.15%) a la ciclohexenona **6**

Cuando la reacción se lleva a cabo con TMSCN y AlMe_3 (Ver *Método B. Parte experimental*), la adición del cianuro es completamente selectiva,

¹⁰⁶ (a) Nagata, W.; Yoshioka, M. *Org. React.* **1977**, 25, 255-476. (b) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Hirai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4635-4643. (c) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Murakami, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4644-4653. (d) *ibid.* 4654-4672. (e) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Terasawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4672-4683.

¹⁰⁷ a) La reacción se da por terminada cuando se observa por TLC (hexano/ AcOEt , 3:1) la desaparición del correspondiente ciclohexenona de partida **6** ($R_f = 0.49$). La ciano- β -cianocetona **9** ($R_f = 0.51$) presenta un color verde-azulado cuando la placa de TLC es revelada con una disolución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina en EtOH. b) La ciano- β -cianocetona **9** es parcialmente soluble en MeOH y bastante más soluble en 1,4-dioxano, por lo que se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se trituró con MeOH y con 1,4-dioxano, filtrándose las suspensiones resultantes a vacío.

¹⁰⁸ a) La cianhidrina **54** se puede purificar por cromatografía en columna (SiO_2) y almacenarse en estado sólido durante 2-3 semanas (a 4°C y bajo atmósfera de argón). b) En presencia de sílica la cianhidrina **54** revierte parcialmente a la ciclohexenona **6**.

¹⁰⁹ En algunos casos se observa el producto de adición 1,2 más el de adición 1,4 ($A_{1,2} + A_{1,4}$).

obteniéndose únicamente el producto de adición 1,4 ($A_{1,4}$), aunque está bien establecido que la reacción de TMS-CN y compuestos carbonílicos α,β -insaturados en presencia de una cantidad catalítica de ácidos de Lewis (como AlMe_3) forman selectivamente las correspondientes *O*-sililcianhidridinas, compuestos de adición 1,2 ($A_{1,2}$).

La asignación estructural de la ciano- β -lactama **9** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.1.1).¹¹⁰

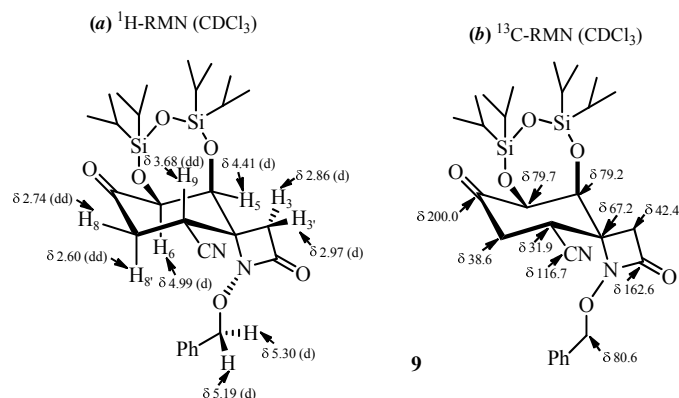


Figura 2.3.1.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la ciano- β -lactama **9**.

En el espectro de ^1H -RMN, los dobletes de dobletes que aparecen a 2.74 ppm ($J = 14.3$ y 5.4 Hz), 2.60 ppm ($J = 14.3$ y 12.4 Hz) y 3.68 ppm ($J = 12.4$ y 5.4 Hz) se asignaron al sistema *ABX* constituido por los respectivos protones H-8, H-8' y H-9.

En el espectro de ^{13}C -RMN, los carbonos C-8 y C-9 aparecen a 38.6 y 31.9 ppm, respectivamente, el carbono del grupo ciano introducido se encuentra a 116.7 ppm y el carbonilo C-7 se desplaza a 200.0 ppm al dejar de estar conjugado.

¹¹⁰ La asignación de las señales de RMN de la ciano- β -lactama **9** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

En el espectro de IR, se observan las bandas de la vibración de tensión características de los enlaces $C\equiv N$ (2250 cm^{-1}), $C=O$ de la cetona (1748 cm^{-1}) y $N-C=O$ de la β -lactama (1784 cm^{-1}).

Por último, en su espectro de masas *LRMS (EI)* aparece el pico molecular m/z 558 (M^+ , 1).

La conformación más estable para el anillo de trioxadisililepano constituido por el grupo protector TIPDS es un bote $^{O(6),Si-O(5)}B$. La conformación mayoritaria del anillo de ciano- β -lactama de **9** es una silla 7C_4 , en la que el grupo CN introducido en C-9(R^*) ocupa una posición ecuatorial, *trans* respecto a los oxígenos de las posiciones C-5(S^*) y C-6(S^*) (Figura 2.3.1.2). Esto se deduce de las constantes de acoplamiento que presenta el protón H-9ax con H-8'ax ($J_{anti} = 12.4\text{ Hz}$) y con H-8ec ($J_{gauche} = 5.4\text{ Hz}$), así como de los NOEs de: H-9 con los protones H-8ec y H-3' (*pro-R^**);¹¹¹ H-6ax (4.99 ppm) con el protón H-8'ax; y H-5ec (4.41 ppm) con el protón H-3 (*pro-S^**) de la β -lactama. Además, el HMBC corrobora esta asignación al observarse correlaciones a tres enlaces del protón H-5ec con los carbonos C-7 y C-9, y del protón H-8ec con los carbonos C-6 y C-4.

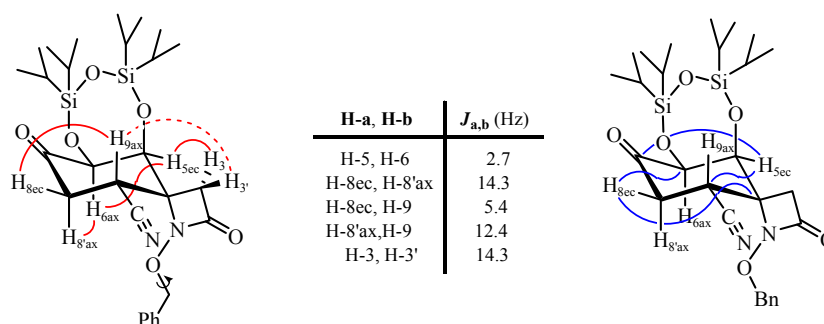


Figura 2.3.1.2. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos de la ciano- β -lactama **9**.

¹¹¹ Las señales de 1H -RMN asignadas al metileno de la β -lactama constituyen un sistema *AB* ($J_{AB} = 14.3\text{ Hz}$) en el que el protón H-3' (2.97 ppm) aparece más desapantallado que H-3 (2.86 ppm).

En cuanto al transcurso estereoquímico, la preparación de las β -cianocetona **9**, por hidrocianación de la ciclohexenona **6**, transcurre de forma totalmente diastereoselectiva por su cara β .

La adición conjugada del cianuro a la ciclohexenona **6** tiene lugar selectivamente por su cara menos impedida, opuesta a los sustituyentes oxigenados y *anti* al metileno de la β -lactama¹¹², a pesar de que los requerimientos estéricos del grupo ciano lineal no son grandes (Figura 2.3.1.3).

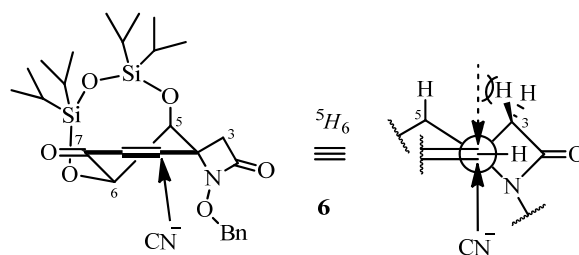
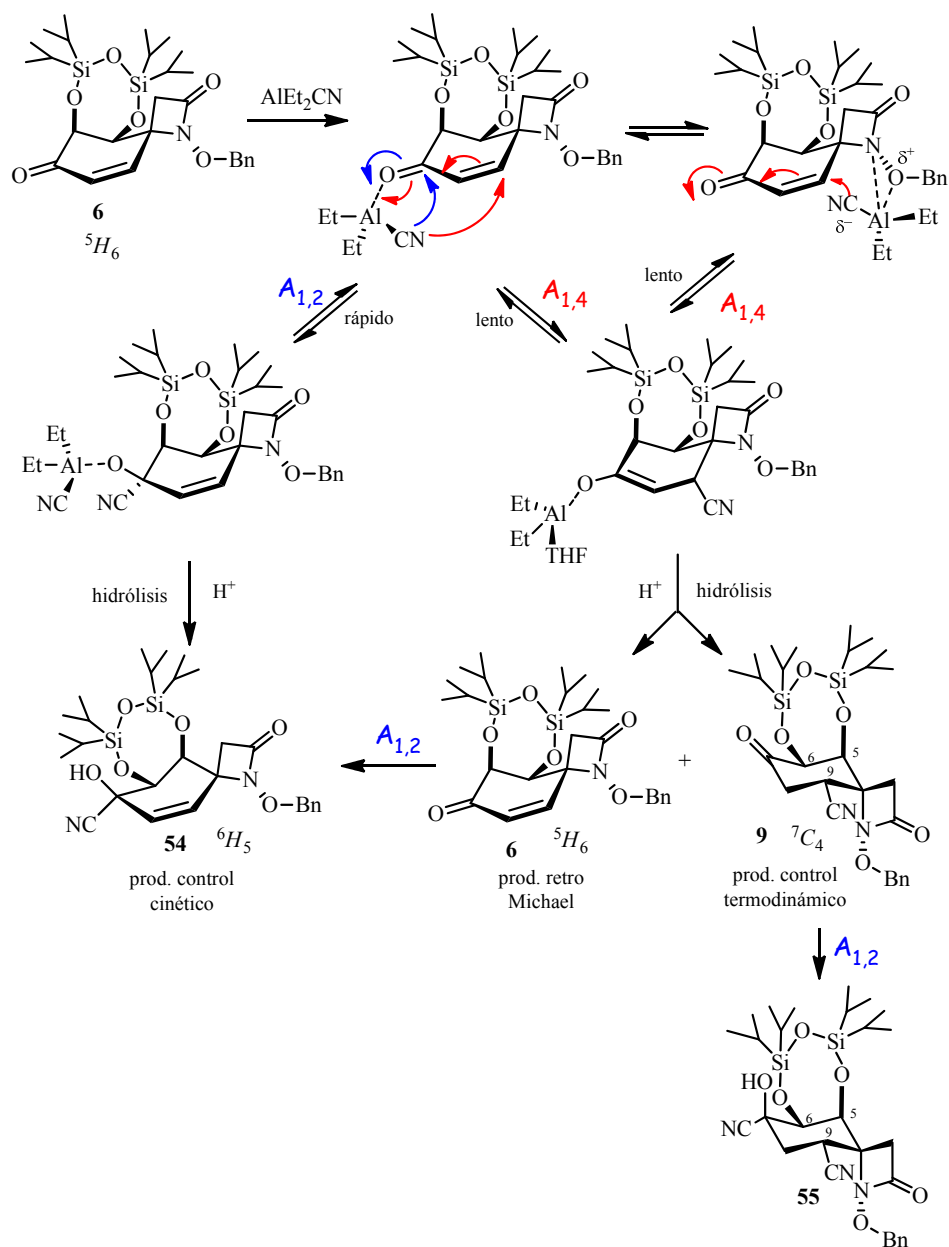


Figura 2.3.1.3. Diastereoselectividad facial en la adición 1,4 de cianuro a las enona **6**.

Según la propuesta mecanística formulada por Nagata y col.¹¹³ para este tipo de reacciones de hidrocianación, las adiciones 1,2 y 1,4 ($A_{1,2}$ y $A_{1,4}$) de cianuro a cetonas α,β -insaturadas son reversibles y, *a priori*, tienen lugar competitivamente (Esquema 2.3.1.2).

¹¹² Independientemente de cuál sea la conformación reactiva de la enona de partida (6H_5 o 5H_6) ya que en el caso de la bisililéter **13** cuya conformación es la contraria a la de la ciclohexenona **6**, la adición del ciano también tiene lugar selectivamente por la cara *anti* al metileno de la β -lactama. Ver *Parte Experimental*.

¹¹³ (a) Nagata, W.; Yoshioka, M. *Org. React.* **1977**, 25, 255-476. (b) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Hirai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4635-4643. (c) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Murakami, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4644-4653. (d) *ibid.* 4654-4672. (e) Nagata, W.; Yoshioka, M.; Terasawa, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 4672-4683.



Clave: $A_{1,2}$ (en color azul); $A_{1,4}$ (en color rojo).

Esquema 2.3.1.2. Propuesta de quelación del Et_2AlCN con la ciclohexenona **6** y formación de los compuestos de adición.

La coordinación del oxígeno del carbonilo, con el aluminio deficiente en electrones del ácido de Lewis, activa el sistema enónico frente al ataque nucleófilo del cianuro.¹¹⁴

En una etapa inicial la rápida A_{1,2} excede a la lenta A_{1,4}, pero según avanza la reacción esta situación se invierte, obteniendo finalmente el aducto 1,4 más estable como producto mayoritario,¹¹⁵ máxime teniendo en cuenta las condiciones de control termodinámico bajo la que se lleva a cabo la reacción (reflujo de THF). Para terminar, la hidrólisis ácida de los intermedios de aluminio generados liberaría las correspondiente cianhidrina **54** (aducto 1,2) y ciano-β-lactama **9** (aducto 1,4) con rendimientos del 15% y 67% respectivamente y con una relación A_{1,2}:A_{1,4}¹¹⁶ de 18:82.

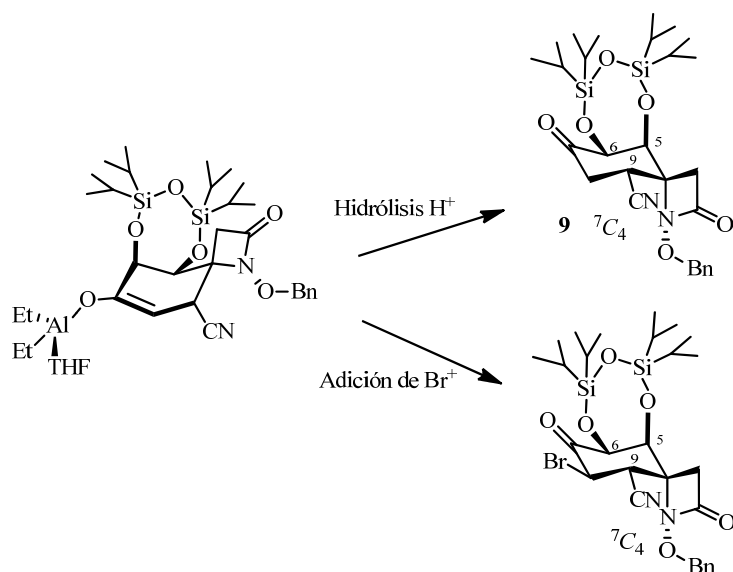
Aunque en la presente Memoria se lleva a cabo la hidrólisis ácida del intermedio de aluminio, se puede adicionar otro electrófilo, como por ejemplo Br⁺.¹¹⁷ (Esquema 2.3.1.3).

¹¹⁴ Utimoto y col. sugieren, de forma análoga a lo propuesto por Nagata y col. para la hidrocianación con HCN-R₃Al, que la especie que actúa como agente de cianación en el *Método A* es el anión complejo [Me₃AlCN]⁻ generado *in situ* por reacción del TMSCN con AlMe₃.

¹¹⁵ De hecho, cuando se trató la cianhidrina **54** con Et₂AlCN, en las condiciones de reacción anteriormente descritas, se obtuvo mayoritariamente la ciano-β-lactama **9**. Es decir, se produce la isomerización del aducto 1,2 (producto cinético) para generar el aducto 1,4 (producto termodinámico).

¹¹⁶ Relación calculada a partir de la masa de los aductos 1,4 y 1,2 puros.

¹¹⁷ La adición de otros electrófilos como Br⁺, se está llevando a cabo, actualmente, en nuestro grupo de investigación. Ver: Raúl Benito Arenas. Síntesis Total del *Core* de *rac*-Tetrodotoxina. Preparación de Compuestos Dioxadamantánicos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, 2012.



Esquema 2.3.1.3. Adición electrófila al enolato de aluminio.

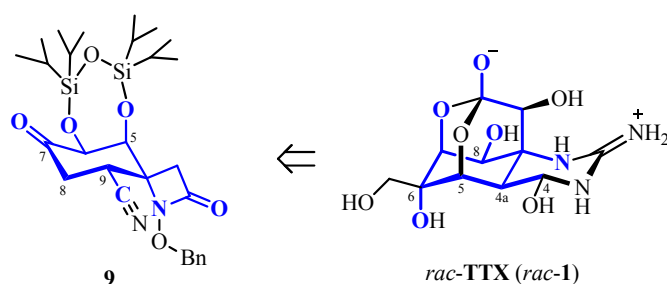
La especialmente rápida $\text{A}_{1,2}$ del Et_2AlCN a la ciclohexenona **6**, que implica un proceso concertado de activación y cianación del grupo carbonilo a través de un estado de transición de cuatro miembros, podría explicar el hecho de que sólo se obtenga la cianhidrina **54** minoritaria (Producto de $\text{A}_{1,2}$).

Se propone la formación previa de un quelato de aluminio del Et_2AlCN con el oxígeno del grupo carbonilo o del sustituyente *N*-benciloxi, o con el nitrógeno que soporta el sustituyente bencilo, facilitándose la transferencia intramolecular del cianuro sobre C-9, por la cara β de la molécula, a través de un estado de transición de seis miembros¹¹⁸ (con el oxígeno) o de cinco miembros (con el nitrógeno) dando lugar a ciano- β -lactama **9** (producto de $\text{A}_{1,4}$) (Esquema 2.3.1.2).

¹¹⁸ Como ejemplo de hidrocianación de compuestos carbonílicos con Et_2AlCN en los que se propone la quelación del sustrato con el reactivo, ver: García Ruano, J.L.; Martín Castro, A.M.; Rodríguez, J.H. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 7235-7241.

Aunque la adición de cianuro da mayoritariamente el compuesto de adición tipo Michael, la ciano- β -lactama **9** también se obtiene la cianhidrina **54** (aducto 1,2) y en pequeñas cantidades la ciano cianhidrina **55**. Se propone que parte de la ciano- β -lactama **9** (aducto 1,4) da la retro-Michael liberando cianuro al medio. Este cianuro atacaría, por un lado, al carbonilo del producto de partida dando lugar a la cianhidrina **54** (aducto 1,2) y por otro lado, al carbonilo del compuesto de adición Michael formándose la ciano cianhidrina **55**.

La formación de la ciano cianhidrina **55** tiene lugar en el tratamiento de la reacción.¹¹⁹ Al triturar el bruto de reacción con metanol¹²⁰ varias veces, se solubiliza el cianuro favoreciéndose la formación de la ciano cianhidrina **55**.¹²¹



Esquema 2.3.1.4. Relación estructural entre *rac*-TTX (*rac*-1) y la ciano β -lactama **9** (en color azul se muestra su esqueleto común).

Mediante una adición tipo Michael de cianuro se ha sintetizado de forma regio- y estereoselectiva la ciano- β -lactama **9** incorporándose así el futuro

¹¹⁹ Ver *Parte Experimental*.

¹²⁰ Por TLC se observa mayoritariamente la ciano- β -lactama **9** y un poco del producto de adición 1,2, la cianhidrina **54**, pero no se aprecia la ciano cianhidrina **55**.

¹²¹ Cuando al finalizar la reacción, se elimina el disolvente a presión reducida y el bruto de la reacción se purifica por cromatografía en columna no se obtiene la ciano cianhidrina **55**.

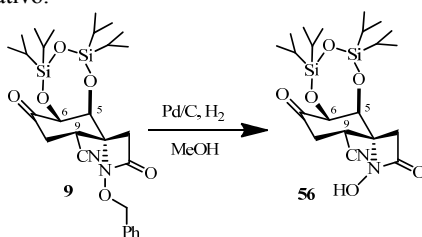
carbono C-4 de la TTX. Además, presenta la estereoquímica propia de la *epi*-4a-TTX en el centro estereogénico generado en C-9 (Esquema 2.3.1.4).^{122,123}

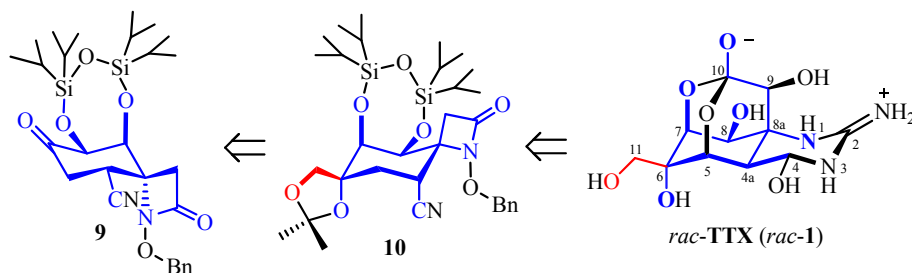
2.3.2. Síntesis del cianoacetal **10**

De acuerdo con el esquema retrosintético propuesto en el apartado de *Plan de Trabajo* (Esquema I), la cianodimetilacetal **10**, será el siguiente intermedio a sintetizar. Este cianoacetal **10** posee la funcionalidad adecuada para la incorporación del carbono C-2 que se encuentra en *rac*-TTX (*rac*-**1**) y se preparará a partir de la ciano- β -lactama **9**, mediante una secuencia de reacciones que implica: i) reacción de Wittig que conlleva la incorporación del carbono C-11 de *rac*-TTX, ii) dihidroxilación estereoselectiva que conlleva la incorporación de la funcionalidad oxigenada con la estereoquímica adecuada en las futuras posiciones C-6 y C-11 y iii) protección como su dimetilacetal del sistema 1,2-diol previamente generado. (Esquema 2.3.2.1).

¹²² Aprovechando la acidez del protón en α al grupo nitrilo de la ciano- β -lactama **9**, la epimerización de su centro estereogénico C-9 (futuro C-4a de TTX), vía cetanimina, permitirá acceder al correspondiente epímero *epi*-**9** que incorpora el carbono C-4 de TTX con la estereoquímica propia de ésta.

¹²³ La reacción de la ciano- β -lactama **9** y paladio sobre carbono (10%) en atmósfera de hidrógeno, utilizando 1,4-dioxano como disolvente, dio lugar a la hidroxilactama **56** como un sólido blanco con un rendimiento cuantitativo.





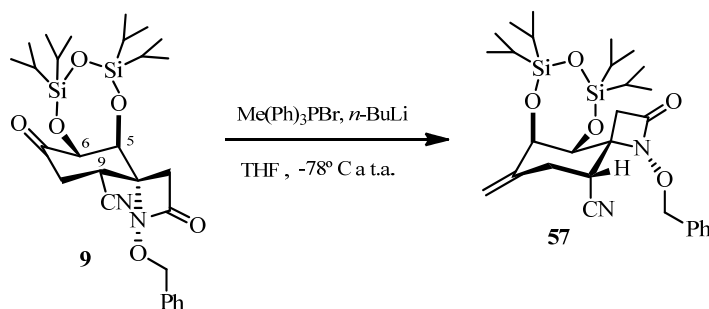
Esquema 2.3.2.1. Esquema retrosintético del cianoacetal **10**, y su relación estructural con *rac*-TTX (*rac*-**1**) (en color azul se muestra su esqueleto común, destacando en rojo el nuevo centro incorporado).

El cianoacetal **10** presenta en su esqueleto diez carbonos (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos presentes en *rac*-**1**, el futuro nitrógeno N-1, los grupos hidroxilo e hidroximetilo en C-6 con la estereoquímica adecuada y las posiciones oxigenadas C-7 y C-8 con una disposición estereoquímica anti respecto al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en la *rac*-TTX.

2.3.2.1. Preparación del cianoalqueno **57**

La reacción de Wittig¹²⁴ de la ciano-β-lactama **9** con metiluro de trifenilfosfonio, generado *in situ* por desprotonación de la sal de fosfonio comercial, condujo a la formación del cianoalqueno **57** (Esquema 2.3.2.1.1).

¹²⁴ a) Wittig, G.; Schöllkopf, U. *Chem. Ber.* **1954**, *87*, 1318-1330. (b) Sobre la síntesis de alquenos utilizando iluros de fósforo, ver: Kelly, S.E. en *Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B.M.; Fleming, I., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1991; vol. 1, p. 755-782. (c) Reviews sobre la reacción de Wittig, ver: a) Edmonds, M.; Abell, A. *Modern carbonyl olefination*; Takeda, T., Ed: Wiley-VCH: Weinheim, Germany **2004**, Capítulo 1. b) Vedejs, E.; Peterson, M.J. *Top. Stereochem.* **1994**, *21*, 1-157. c) Maryanoff, B.E.; Reitz, A.B. *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 863-927. Bestmann, H.J.; Vostrowsky, O. *Top. Curr. Chem.* **1983**, *109*, 85-164.



Esquema 2.3.2.1.1. Reacción de Wittig de la ciano-β-lactama **9**.

La preparación del fosforano constió en la adición de *n*-BuLi, a -78 y bajo atmósfera de argón, sobre una suspensión de bromuro de trifenilfosfonio en THF. Sobre la disolución amarilla de iluro resultante, se añadió, lentamente a -78 °C, la ciano-β-lactama **9** disuelta en THF. Después de 5 horas a temperatura ambiente, el aislamiento y la purificación, dio lugar al cianoalqueno **57** con un rendimiento del 49% como un sólido blanco (Esquema 2.3.2.1.1).

El rendimiento de la reacción depende de la pureza de la sal de fosfonio utilizada¹²⁵ y el número de equivalentes de iluro formado.

La difracción de rayos X¹²⁶ de un cristal del cianoalqueno **57**, se realizó con objeto de confirmar la conformación del anillo ciclohexano-β-lactámico.

En la Figura 2.3.2.1.1 se muestra la numeración de los átomos¹²⁷ y una representación de la molécula teniendo en cuenta los valores obtenidos para las coordenadas atómicas.¹²⁸

¹²⁵ Previamente, la sal de fosfonio se seca, durante 24 horas, en un desecador conectado a vacío y provisto de pentóxido de fosforo como agente desecante.

¹²⁶ La resolución de la cianoalqueno de **57** por difracción de rayos X fue realizada por los Drs. Lluís Solà y Jordi Benet-Buchholz en la Unidad de Investigación de Polimorfismo del Instituto Catalán de Investigación Química de Tarragona, empleando un difractómetro *Bruker-Nonius* con detector de área *APPEX 2 4K CCD* y el programa *SHELXSTL v.6.10*.

¹²⁷ En la discusión de los datos cristalográficos de cianoalqueno **57**, se empleará la misma numeración de átomos que la establecida al obtener su estructura por difracción de rayos X (ver Figura 2.3.2.1.1).

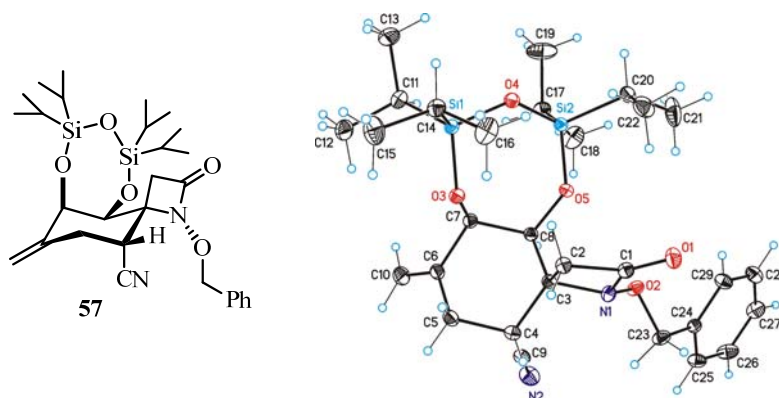


Figura 2.3.2.1.1. Representación de la estructura molecular de cianoalqueno **57** obtenida por difracción de rayos X.

En estado sólido, el anillo de seis miembros C(3-8) presenta una conformación tipo silla 4C_7 , mientras que el anillo de β -lactama es casi plano, siendo el ángulo de torsión C(3)-N(1)-C(1)-C(2) de $\pm 10.75(4)^\circ$.¹²⁹ El anillo aromático del grupo *N*-benciloxi es plano y se dispone *anti* respecto al nitrógeno, como sugiere el ángulo de torsión N-O3-C9-C10 de $\pm 169.91(6)^\circ$. Los oxígenos sililados sobre los carbonos C-8 (ecuatorial) y C-7 (axial) se encuentran *cis* entre ellos (el ángulo de torsión O(3)-C(7)-C(8)-O(5) es de $\pm 53.36(8)^\circ$) y *trans* al nitrógeno β -lactámico N-1 (el ángulo de torsión N(1)-C(3)-C(8)-O(5) es de $\pm 52.48(7)^\circ$). El grupo ciano ocupa una posición axial, *trans* respecto a los oxígenos de las posiciones C-7(*S**) y C-8(*S**) y *cis* al N-1 (el ángulo de torsión C(9)-C(4)-C(5)-C(6) es de $\pm 69.63(8)^\circ$, el de C(2)-C(3)-C(4)-C(9) es de $\pm 154.35(6)^\circ$, el de C(8)-C(3)-C(4)-C(9) es de $\pm 71.06(8)^\circ$, el de N(1)-C(3)-C(4)-C(9) es de $\pm 58.20(8)^\circ$ y el de C(8)-C(3)-C(4)-C(9) es $\pm 58.20(8)^\circ$).

¹²⁸ Las longitudes de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos de torsión obtenidos para el cianoalqueno **57** se resumen en el Anexo A de la presente Memoria.

¹²⁹ En la celda de esta estructura la mitad de las moléculas tienen ángulos de torsión de signo cambiado a la otra mitad.

La conformación más estable para el anillo de trioxadisililepano constituido por el grupo protector TIPDS es un bote $O(6), Si-O(5)B$.

La asignación de los protones y carbonos de cianoalqueno **57** se realizó en función de sus datos espectroscópicos.¹³⁰ (Figura 2.3.2.1.2).

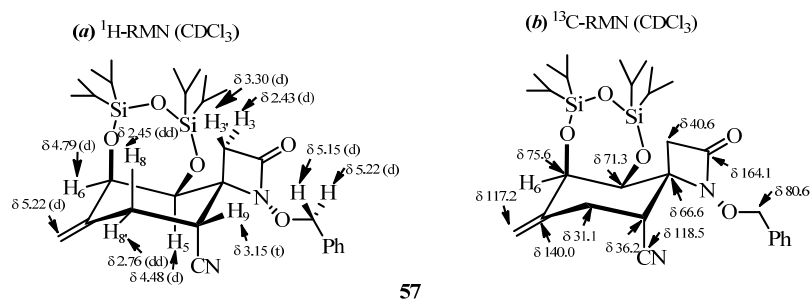


Figura 2.3.2.1.2. Selección de datos espectroscópicos de 1H -RMN y ^{13}C -RMN del cianoalqueno **57**.

En el espectro de 1H -RMN, el doblete que integra para dos protones y aparece a 5.22 ppm, se asignó a los protones H-10 y H-10' del doble enlace generado en la reacción. Los dobletes de dobletes que aparecen a 2.76 ppm ($J = 13.6$ y 4.0 Hz) y 2.45 ppm ($J = 13.6$ y 4.0 Hz) junto con el triplete a 3.15 ppm ($J = 4.0$ Hz) se asignaron al sistema *ABX* constituido por los respectivos protones H-8, H-8' y H-9. En el espectro de ^{13}C -RMN, los carbonos C-8 y C-9 aparecen a 31.1 y 36.2 ppm, respectivamente, el carbono del grupo ciano aparece a 118.5 ppm, el carbonilo C-7 se apantalla a 140.0 ppm al dejar de ser un carbonílico y el nuevo carbono generado en la reacción C-11 aparece a 117.2 ppm.

En el espectro de IR, se observan las bandas de la vibración de tensión características de los enlaces $C\equiv N$ (2238 cm^{-1}) y la tensión $N-C=O$ de la β -lactama

¹³⁰ La asignación de las señales de RMN de **57** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC, HMBC y NOESY.

(1783 cm^{-1}). A 1672 y 1631 cm^{-1} se aprecian dos señales correspondientes a la vibración de tensión de los enlaces C=C presentes en la molécula.

Por último, en su espectro de masas *LRMS (EI)* aparece el pico molecular m/z 557 (M+H).

Los datos obtenidos en disolución se refuerzan con los obtenidos en rayos X (estado sólido). En disolución la conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano del cianoalqueno **57** es una silla 4C_7 , en la que el grupo CN ocupa una posición axial, *anti* respecto a los oxígenos de las posiciones C-5(S^*) y C-6(S^*) (Figura 2.3.2.1.3).

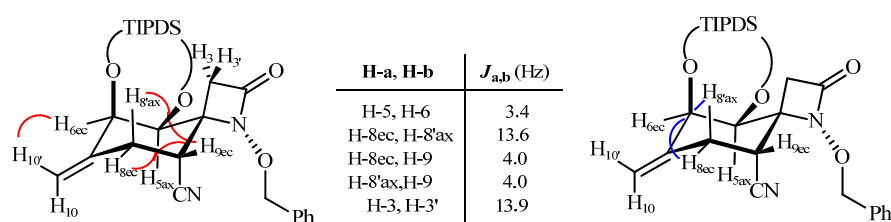


Figura 2.3.2.1.3. Relación de constantes de acoplamiento, correlaciones HMBC (en color azul) y NOEs (en color rojo) más significativos del cianoalqueno **57**.

Esto se deduce de la constante de acoplamiento que presenta el protón H-9ax con H-8 y H-8' ($J = 4.0$ Hz), así como de los NOEs de: H-9 con los protones H-3'(*pro-S**)¹³¹, H-8ax y H-8'ec, H-6ec (4.79 ppm) con los protones H-10' y H-5ec. Además, el HMBC corrobora esta asignación al observarse una correlación a tres enlaces del protón H-8ec con los carbonos C-6 más intensa que la del protón H-8'ax con el carbono C-6.¹³²

¹³¹ Las señales de ${}^1\text{H}$ -RMN asignadas al metileno de la β -lactama constituyen un sistema *AB* ($J_{AB} = 13.9$ Hz) en el que el protón H-3' (2.43 ppm) aparece más desapantallado que H-3 (3.30 ppm).

¹³² Por HMBC se observa una correlación de H-3' a cuatro enlaces con C-6, esto es debido a la contribución de la silla 7C_4 .

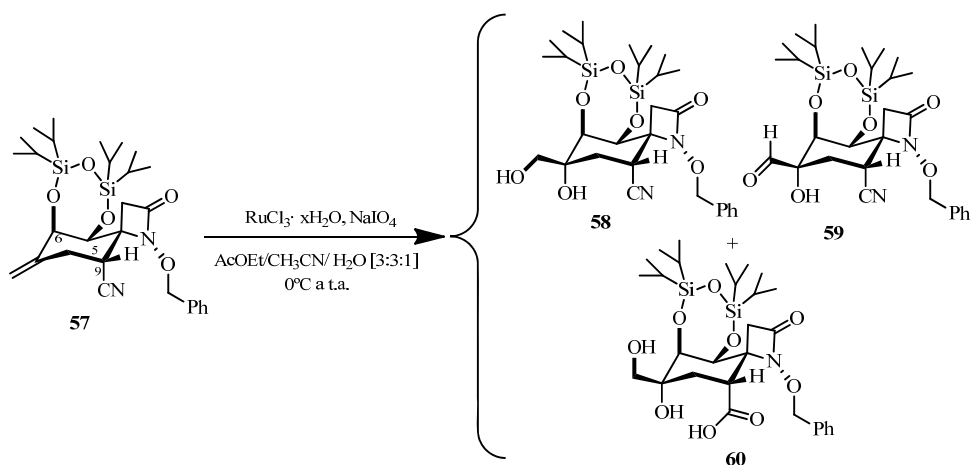
Es importante destacar el cambio conformacional que experimenta el anillo de ciclohexenona durante la reacción de Wittig. La silla 7C_4 de la ciano- β -lactama **9** pasa a ser mayoritariamente una silla 4C_7 en el cianoalqueno **57** donde el grupo oxigenado de C-6 ocupa una posición axial y el grupo oxigenado de C-5 ocupa una posición ecuatorial.

2.3.2.2. Preparación del 1,2-diol **58**

Una vez introducido en carbono C-11 de la *rac*-TTX, la oxidación del doble enlace nos permite funcionalizar adecuadamente las futuras posiciones C-6 y C-11 de *rac*-TTX (*rac*-**1**).

La reacción de cianoalqueno **57** en una mezcla de acetato de etilo/acetonitrilo/agua y una disolución de tricloruro de rutenio hidratado y peryodato sódico, después de 10 minutos a 0°C, tras el aislamiento¹³³ y la purificación condujo al *cis*-1,2-diol **58** como sólido blanco con un 66% de rendimiento, al cianohidroxialdehído **59** como un aceite transparente con 6% de rendimiento y al diolácido **60** como un sólido blanco con un 7% de rendimiento. (Esquema 2.3.2.2.1).

¹³³ Si en la etapa de aislamiento, en lugar de añadir Na₂HPO₄ se añade NaHSO₃ saturado se obtiene como producto mayoritario el cianohidroxialdehído **59** con 40% de rendimiento y el *cis*-1,2-diol **58** como producto minoritario con un 20% de rendimiento.



Esquema 2.3.2.2.1. Reacción de dihidroxilación del cianoalqueno **57**.

La reacción de dihidroxilación se llevó a cabo utilizando tetróxido de rutenio (VIII)^{134,135} como catalizador. El oxidante catalíticamente activo fue generado *in situ* a partir de cantidades catalíticas de tricloruro de rutenio y de peryodato sódico en una mezcla de $\text{AcOEt/CH}_3\text{CN/H}_2\text{O}$ [3:3:1] como disolvente.¹³⁶

¹³⁴ Reacciones de oxidación catalizadas por rutenio, ver: (a) Pagliaro, M.; Campestrini, S.; Ciriminna, R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 837-845. (b) Plietker, B.; Niggemann, M. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 2403-2407. (c) Naota, T.; Takaya, H.; Shun-Ichi Murahashi, S.-I. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2599-2660.

¹³⁵ En general, en estas condiciones las reacciones de dihidroxilación de alquenos son muy rápidas, pero debido a su alto potencial redox ($E^\circ \text{Ru(VIII)/Ru(VI)}$: 1.400 V) la selectividad puede disminuir y la oxidación es más difícil de controlar, siendo reacciones secundarias comunes la formación de cetoles y de productos de ruptura oxidativa de la olefina. Sobre la *cis*-dihidroxilación de olefinas catalizadas por RuO_4 , ver: (a) Plietker, B.; Niggemann, M.; Pollrich, A. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 1116-1124. (b) Shing, T.K.M.; Tam, E.K.W.; Tai, V.W.-F.; Cheng, I.H.F.; Jiang, Q. *Chem. Eur. J.* **1996**, 2, 50-57. (c) Plietker, B.; Niggemann, M. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2402-2405. (d) Plietker, B.; Niggemann, M. *Org. Lett.* **2003**, 5, 3353-3356. (e) Shing, T.K.M.; Tai, V.W.-F.; Tam, E.K.W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2312-2313.

¹³⁶ La reacción se lleva a cabo en un sistema bifásico, empleando como disolvente una mezcla $\text{MeCN/AcOEt/H}_2\text{O}$ en una proporción [3:3:1], y por tanto requiere una agitación vigorosa. El contacto entre el RuO_4 y la olefina tiene lugar en la fase orgánica (donde ambos son solubles). El RuO_2 generado en la oxidación es insoluble en los tres disolventes y migra a la interfase

El tratamiento del cianoalqueno **57** en las condiciones de dihidroxilación, tetróxido de osmio¹³⁷ y NMO en una mezcla acetona/agua/1,4-dioxano [7:1:1], condujo, tras 5 días a temperatura ambiente, tras su aislamiento y su purificación al *cis*-1,2-diol **58** con un rendimiento del 21%.

La asignación estructural del *cis*-1,2-diol **58**, producto mayoritario de la reacción, se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.2.2.1).¹³⁸

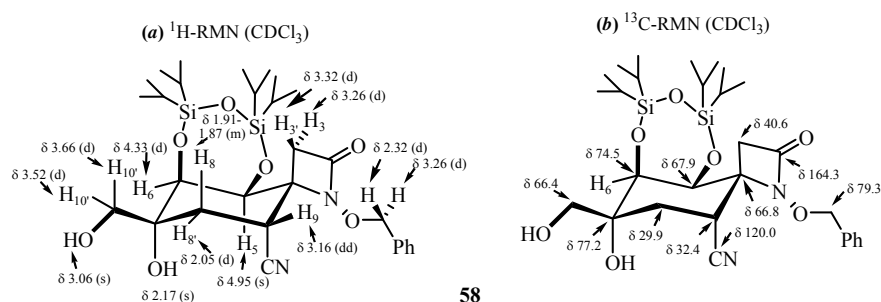


Figura 2.3.2.2.1. Selección de datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN del *cis*-1,2-diol **58**.

En el espectro de ¹H-RMN, los dobletes centrados a 3.66 y 3.52 ppm se asignaron al sistema *AB* ($J = 10.5$ Hz) constituido por los correspondientes protones del metilo unido al oxígeno (H-10 y H-10'). Los singletes situados a 3.06 y 2.17 ppm se asignaron a los dos grupos hidroxilos introducidos. Por otra parte, el doblete de dobletes localizado a 3.16 ppm, con constantes de acoplamiento 4.7

donde es reoxidado por el NaIO₄ de la fase acuosa. Sobre el efecto del disolvente en la reacciones de oxidación catalizadas por rutenio, ver: Shing, T.K.M.; Tam, E.K.W. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 2179-2180. La adición de MeCN previene la inactivación del catalizador y es crucial para aumentar la efectividad de la oxidación, ver: Carlsen, P.H.J.; Katsuki, T.; Martin, V.S.; Sharpless K.B. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3936-3038.

¹³⁷ El OsO₄ es un agente oxidante menos potente que el RuO₄ (E° Os(VIII)/Os(VI): 1.020 V; E° Ru(VIII)/Ru(VI): 1.400 V) por lo que las reacciones de dihidroxilación son más lentas y la oxidación es más fácil de controlar.

¹³⁸ La asignación de las señales de RMN del diol **58** está apoyada en NOEs mono-dimensionales y en los siguientes experimentos bidimensionales: COSY, HSQC y HMBC.

y 2.8 Hz, se asignó al protón en α al ciano (H-9). Los protones H-5 y H-6 aparecen como singlete ancho (4.95 ppm) y doblete (4.33 ppm), respectivamente.

En el espectro de ^{13}C -RMN, las señales que aparecen a 77.2 y 66.4 ppm se asignaron a C-7 y C-10, respectivamente.

En el espectro de IR, la banda ancha e intensa que aparece a 3468 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión de los OH del diol. Se observan las bandas características de vibración de tensión de los enlaces $\text{C}\equiv\text{N}$ (2243 cm^{-1}) y la tensión $\text{N}-\text{C}=\text{O}$ de la β -lactama (1775 cm^{-1}).

El espectro de masas *LRMS (API-ES⁺)* presenta los picos m/z 591 ($\text{M}+\text{H}^+$), 592 ($\text{M}+2\text{H}^+$), 613 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 614 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}^+$), 1203 ($2\text{M}+\text{Na}^+$).

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano en disolución es de una silla $^4\text{C}_7$, deducible del acoplamiento a larga distancia entre el protón H-6 y H-8' observada en el experimento COSY. Además, teniendo en cuenta que la multiplicidad de la señal de ^1H -RMN asignada al hidrógeno H-9 es un doblete de dobletes con unas constantes de acoplamiento tipo *gauche* (4.7 y 2.8 Hz), con H-8 y H-8', el ciano tiene que ocupar una disposición axial sobre el carbono C-9, por lo que el carbono que soporta el ciano no ha sufrido epimerización y presenta la misma configuración que el cianoalqueno **57** (Figura 2.3.2.2.2).

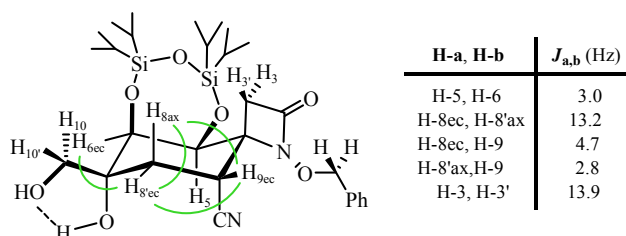


Figura 2.3.2.2.2. Relación de constantes de acoplamiento y acoplamientos COSY (en color verde) más significativos del *cis*-1,2-diol **58**.

Se propone que la cadena de hidroximetilo ecuatorial posee una conformación mayoritaria en la que los grupos hidroxilo del *cis*-1,2-diol se encuentran en disposición *cis*, presumiblemente estabilizada por la formación del enlace de hidrógeno intramolecular. (Figura 2.3.2.2.2).^{139,140}

Considerando la conformación mayoritaria 4C_7 del cianoalqueno **57** como la más reactiva, la adición electrófila del oxidante al doble enlace (activada por los oxígenos del ciclo sililado) tendrá lugar por la cara menos impedida (cara β), *anti* al sustituyente voluminoso sililéter axial de C-6.

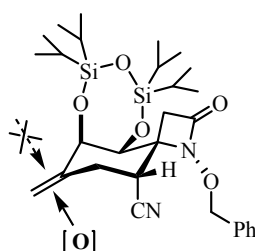


Figura 2.3.2.2.3. Diastereoselección facial en la dihidroxilación del *cis*-1,2-diol **58**.

Como producto secundario de la reacción se obtiene el cianohidroxialdehído **59**.

¹³⁹ Para unas discusiones generales sobre los enlaces de hidrógeno en compuestos orgánicos, ver: (a) Jeffrey, G.A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*; Oxford University Press: Oxford, 1997. (b) Jeffrey, G.A.; Saenger, W. *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 1991. (c) Etter, M.C. *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 120-126. (d) Joesten, M.D. *J. Chem. Educ.* **1982**, *59*, 362-366. (e) Kollman, P.A.; Allen, L.C. *Chem. Rev.* **1972**, *72*, 283-303.

¹⁴⁰ Para algunos ejemplos de detección de enlaces de hidrógeno intra- e intermoleculares mediante espectroscopía de IR y ^1H -RMN, ver: (a) López de la Paz, M.; Ellis, G.; Pérez, M.; Perkins, J.; Jiménez-Barbero, J.; Vicent, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 840-855. (b) Bernet, B.; Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 995-1021. (c) Pearce, C.M.; Sanders, J.K.M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1119-1124. (d) Fraser, R.R.; Kaufman, M.; Morand, P.; Govil, G. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 403-409.

La asignación estructural del cianohidroxialdehído **59** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.2.2.4).¹⁴¹

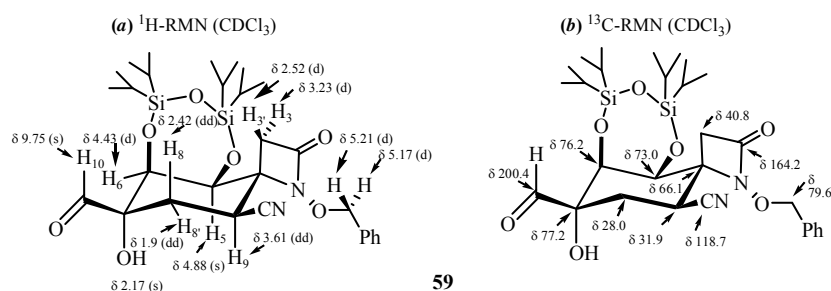


Figura 2.3.2.2.4. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del cianohidroxialdehído **59**.

La conformación mayoritaria del anillo de ciclohexano en disolución es de una silla 4C_7 , deducible del acoplamiento a larga distancia entre el protón H-6 y H-8' observada en el experimento COSY. Además, los experimentos NOESY corroboran dicha conformación. El protón H-9 (3.36 pm) da lugar a un NOE con H-8, otro con H-8' y otro con H-3'. El grupo ciano ocupa una disposición axial sobre el carbono C-9 (Figura 2.3.2.2.5).

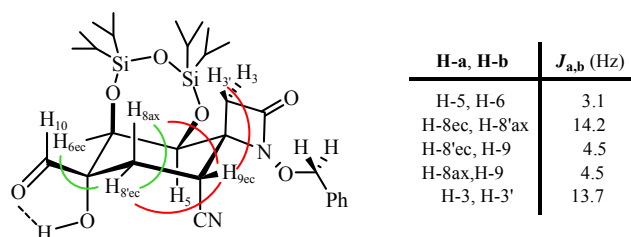


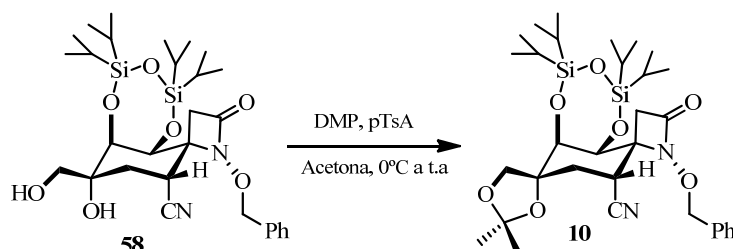
Figura 2.3.2.2.5. Relación de constantes de acoplamiento, acoplamientos COSY (en color verde) y NOESY (en color rojo) más significativos del cianohidroxialdehído **59**.

¹⁴¹ La asignación de las señales de RMN del cianohidroxialdehído **59** está apoyada en los siguientes experimentos bidimensionales: NOESY, COSY, HSQC y HMBC.

2.3.2.3. Preparación del cianoacetal **10**

A continuación, se llevó a cabo la protección simultánea de los dos hidroxilos del *cis*-1,2- diol **58** con un grupo protector bifuncional, el dimetilacetal, de forma que la segunda protección sea intramolecular y dé lugar a ciclos de cinco miembros.¹⁴²

La adición de cantidades catalíticas de *p*-TsOH sobre una disolución del ciano *cis*-1,2-diol **58** y 2,2-dimetoxipropano en acetona a 0°C,¹⁴³ dio lugar, después de tres días a temperatura ambiente, tras aislamiento y purificación por columna cromatográfica, al cianoacetal **10** como un sólido blanco con un rendimiento del 87% (Esquema 2.3.2.3.1).



Esquema 2.3.2.3.1. Reacción de protección del *cis*-1,2-diol **58**.

La asignación estructural del cianoacetal **10** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.2.3.1).¹⁴⁴

¹⁴² Para la protección de 1,2-dioles como acetónidos ver: a) Konno, H.; Makabe, H.; Tanaka, A.; Oritani, T. *Tetrahedron* **1996**, 52, 9399-9408; b) Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: Hoboken, **2007**. pp.: 306-321; c) Kocienski, P. J. *Protecting Groups*; Thieme: Stuttgart, **2005**. pp.: 119-133.

¹⁴³ Para un ejemplo del empleo de estas condiciones de reacción ver: Lipshutz, B. H.; Barton, J. C. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 4495-4499.

¹⁴⁴ La asignación de las señales de RMN del cianoacetal **10** está apoyada en los experimentos bidimensionales: NOESY, COSY, HSQC y HMBC.

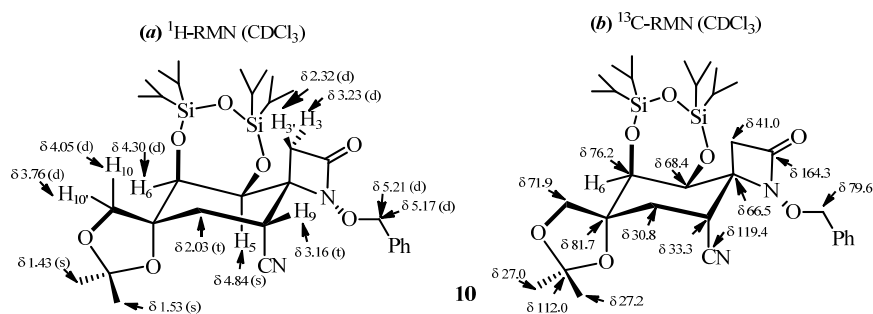


Figura 2.3.2.3.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del cianoacetal **10**.

En ^1H -RMN, los singletes situados a 1.53 y 1.43 ppm, que integran para tres protones cada uno, se asignaron a los dos nuevos grupos metilo introducidos. Los dobletes centrados a 3.76 y 4.05 ppm se asignaron al sistema *AB* ($J = 9.2$ Hz) constituido por los correspondientes protones del metilo unido al oxígeno (H-10' y H-10). Por otra parte, el triplete localizado a 3.16 ppm, con una constante de acoplamiento de 3.9 Hz, se asignó al protón en α al ciano (H-9). El triplete situado a 2.03 ppm, que integra para dos protones, se asignó a los protones H-8 y H-8'. Los protones H-5 y H-6 aparecen como singlete ancho (4.84 ppm) y doblete (4.30 ppm), respectivamente.

En el espectro de ^{13}C -RMN, las señales asignadas a los carbonos unidos del *cis*-1,2-diol de partida **58** (C-7 a 77.2 ppm y C-10 a 66.4 ppm) son reemplazadas por las pertenecientes a los carbonos del nuevo ciclo formado (C-7 a 81.7 ppm y C-10 a 71.9 ppm). Las señales situadas a 27.0 y 27.2 ppm se asignaron a los nuevos carbonos de los metilos. La señal situada a 112.0 ppm se asignó al carbono acetálico del anillo 1,3-dioxolano.

El espectro de masas *LRMS (API-ES)*⁺, presenta los picos m/z 631 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ y 653 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

La conformación mayoritaria en disolución del anillo de ciclohexano del cianoacetal **10** es una silla 4C_7 , deducible del experimento de HMBC, al observarse un punto de cruce entre el protón H-6 y el carbono C-4, y los puntos de cruce entre el protón H-9 y los carbonos C-7 y C-5. En los experimentos NOESY, el protón H-3' (2.32 ppm) da lugar a un NOE con H-8 y H-8' y otro con H-9, el protón H-10' (3.76 ppm) da un NOE con H-6, y el protón H-10 (4.05 ppm) da un NOE con H-8 y H-8'. Además, en el espectro de ${}^1\text{H}$ -RMN el protón H-9 (3.16 ppm) es un triplete que presenta una constante *gauche* con los protones H-8 y H-8' típica de esta conformación, mientras que si la conformación fuese una silla 7C_4 presentaría una constante *trans* y otra *gauche*. (Figura 1.3.2.3.2).

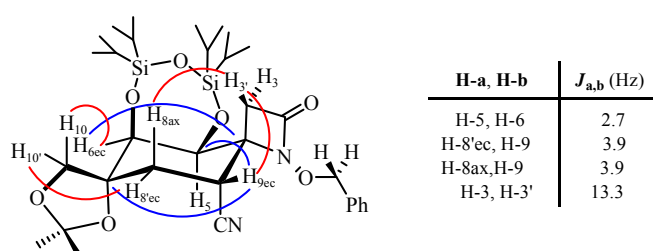


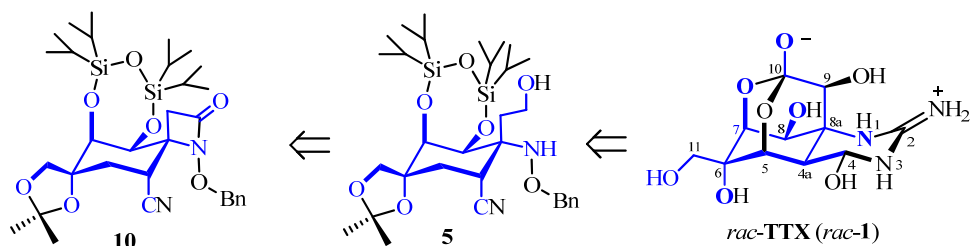
Figura 2.3.2.3.2. Relación de constantes de acoplamiento, acoplamientos HMBC (en color azul) y NOESY (en color rojo) más significativos del cianoacetal **10**.

El anillo de cinco miembros¹⁴⁵ del cianoacetal **10** está probablemente pseudorotando ya que se observan todas las conformaciones posibles. Suponemos que esto se debe a que tiene una barrera energética muy baja.

¹⁴⁵ Para el análisis conformacional de los anillos de cinco miembros emplearemos la nomenclatura utilizada para la descripción conformacional de los anillos de furanosa (Tipo S y N), en base al concepto de pseudorotación. Ver: a) Sundaralingam, M.; Altona, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 8205-8212; b) Meldgaard, M.; Wengel, J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **2000**, 3539-3554; c) Bryld, T.; Sørensen, M. H.; Nielsen, P.; Koch, T.; Nielsen, C.; Wengel, J. *J. Chem. Soc.; Perkin Trans. I*, **2002**, 1655-1662.

2.3.3. Síntesis del aminoalcohol **5**

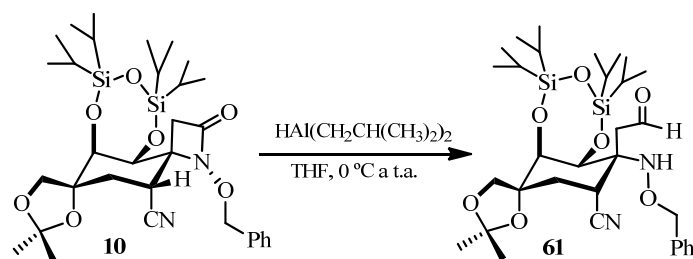
De acuerdo con el esquema retrosintético propuesto en el apartado de *Plan de Trabajo* (Esquema I), el aminoalcohol **5**, será el siguiente intermedio a sintetizar. Este aminoalcohol **5** posee la funcionalidad adecuada para la incorporación del carbono C-2 que se encuentra en *rac*-TTX (*rac*-**1**). Se preparará a partir del cianoacetal **10** mediante una reacción de reducción de la β -lactama y posterior reducción del aldehído formado a alcohol. (Esquema 2.3.3.1).



Esquema 2.3.3.1. Esquema retrosintético del aminoalcohol **5**, y su relación estructural con *rac*-TTX (*rac*-**1**).

2.3.3.1. Preparación del acetaldehído **61**

La adición de hidruro de diisopropil aluminio (DIBAL) sobre una disolución de cianoacetal **10** en THF a 0°C , dio lugar, después de 19 horas a temperatura ambiente, y tras aislamiento y purificación por columna cromatográfica, al acetaldehído **61** como un sólido blanco con un rendimiento del 87% (Esquema2.3.3.1.1).



Esquema 2.3.3.1.1. Reducción del cianoacetal **10** al acetaldehído **61**.

La asignación estructural del acetaldehído **61** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.3.1.1).¹⁴⁶

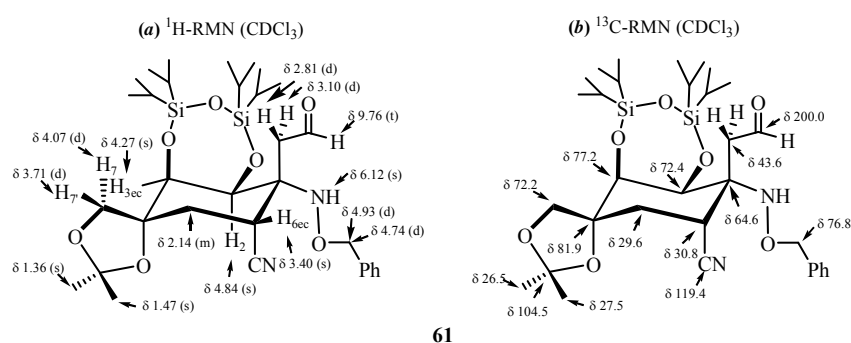


Figura 2.3.3.1.1. Selección de datos espectroscópicos de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de acetaldehído **61**.

En ^1H -RMN, el triplete situados a 9.76 que integra para un protón se asignó al nuevo protón del aldehído introducido y el singlete que aparece a 6.12 ppm que integra para un protón se asignó al nuevo protón amina introducido. El sistema *AB* formado por los protones situados a 3.10 y 2.81 ppm, que integran para un protón cada uno, se asignaron a los protones en α al aldehído.

¹⁴⁶ La asignación de las señales de RMN del acetaldehído **61** está apoyada en los experimentos bidimensionales: NOESY, COSY, HSQC y HMBC.

En el espectro de ^{13}C -RMN, la señal asignada al carbono carbonílico de la β -lactama (C-2 a 164.3 ppm) es reemplazada por el perteneciente al carbono del aldehído formado (a 200.0 ppm).

En el espectro de IR, se observan las bandas de la vibración de tensión características de los enlaces $\text{C}\equiv\text{N}$ (2244 cm^{-1}) y $\text{C}=\text{O}$ del aldehído (1717 cm^{-1}).

El espectro de masas *LRMS (API-ES⁺)* presenta los picos m/z 633 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ y 655 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

En disolución el anillo de ciclohexano del acetalaldehído **61** presenta dos conformaciones extremas, una silla $^4\text{C}_1$ y una silla $^1\text{C}_4$, deducibles de los experimentos de HMBC y NOEs monodimensionales. La conformación de silla $^1\text{C}_4$ se deduce del experimento de HMBC, al observarse un punto de cruce entre el protón H-2 y el carbono cuyo desplazamiento aparece a 43.6 ppm asignado al carbono del acetalaldehído. En el experimento NOE, el protón H-5' (2.14 ppm) da lugar a un NOE con los dos protones del CH_2 del acetalaldehído. La conformación de silla $^4\text{C}_1$ se deduce del experimento de HMBC, al observarse los puntos de cruce entre el protón H-2 y los carbonos C-4 y C-6 y el punto de cruce entre el protón H-3 y el carbono C-7. En el experimento NOE, el protón H-5' (2.14 ppm) da lugar a un NOE con los dos protones del CH_2 del acetalaldehído. (Figura 2.3.3.1.2).

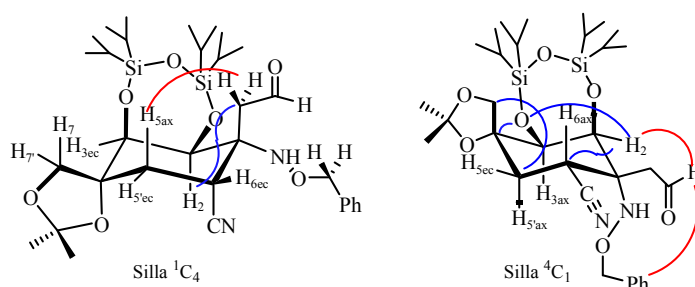
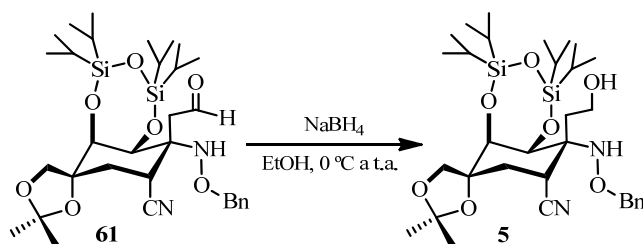


Figura 2.3.3.1.2. Relación de constantes de acoplamiento, acoplamientos HMBC (en color azul) y NOESY (en color rojo) más significativos del acetalaldehído **61**.

2.3.3.2. Preparación del aminoalcohol **5**

La reacción del acetaldehído **61** con borohidruro sódico en etanol a 0°C durante media hora dió lugar, tras el aislamiento y la purificación por columna cromatográfica, al aminoalcohol **5** como un sólido blanco con un rendimiento del cuantitativo.¹⁴⁷ (Esquema 2.3.3.2.1).



Esquema 2.3.3.2.1. Formación del aminoalcohol **5**.

La asignación estructural del aminoalcohol **5** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.3.2.1).¹⁴⁸

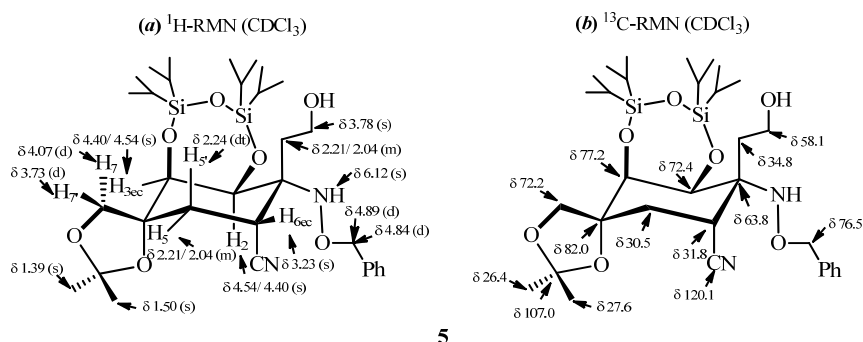


Figura 2.3.3.2.1. Selección de datos espectroscópicos de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de aminoalcohol **5**.

¹⁴⁷ Para ver otras reducciones del cianoaldehído **61** al aminoalcohol **5**, ver *Parte Experimental*.

¹⁴⁸ La asignación de las señales de RMN del aminoalcohol **5** está apoyada en los experimentos bidimensionales: NOESY, COSY, HSQC y HMBC.

En el espectro de ^1H -RMN, el singlete ancho situados a 3.78 que integra para dos protones se asignó al nuevo CH_2 generado al reducir el aldehído. El multiplete situado a 2.21-2.04 ppm que integra para tres protones, se asignó, a dos de los protones en β al alcohol y el otro al protón H-5'.

En el espectro de ^{13}C -RMN, aparece una señal a 58.1 ppm asignada al carbono del metileno que soporta el grupo hidroxilo mientras que la señal del carbono metilénico contiguo aparece a 34.8 ppm. Por otro lado, se observan todas las señales de los carbonos del anillo ciclohexánico, apareciendo C-4 a 82.0 ppm, C-3 a 77.2 ppm, C-2 a 72.4 ppm, C-1 a 63.8 ppm, C-6 a 30.5 ppm, C-5 a 31.8 ppm, junto con la señal asignada al carbono C-7 a 71.7 ppm. La señal que aparece a 120.1 ppm se asignó al carbono del grupo CN. Finalmente, las señales asignadas a los dos metilos del isopropilideno aparecen a 27.6 y 26.4 ppm, mientras que el carbono cuaternario se muestra a 107.0 ppm.

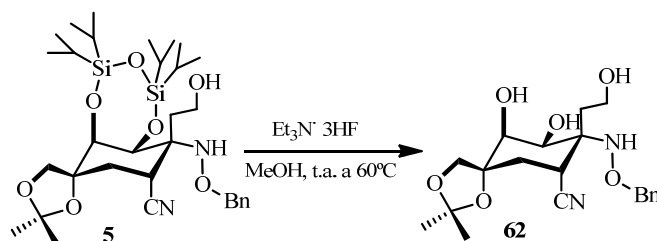
En el espectro IR, se observa las banda de la vibración de tensión característica del enlace O-H (3458 cm^{-1}).

El espectro de masas *LRMS (API-ES⁺)* presenta los picos m/z 635 ($\text{M}+\text{H}$)⁺ y 657 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺.

La conformación del anillo de ciclohexano del aminoalcohol **5** en disolución no se puede deducir con los experimentos realizados, ya que no tenemos datos determinantes.

2.3.3.3. Preparación del aminotriol **62**

La preparación del aminotriol **62** se llevó a cabo por la desprotección del grupo TIPDS¹⁴⁹ del aminoalcohol **5** utilizando Et₃N·3HF en metanol.¹⁵⁰ El aminotriol **62** se obtiene cuantitativamente. (Esquema 2.3.3.3.1).



Esquema 2.3.3.3.1. Preparación del aminotriol **62** por desprotección del grupo TIPDS.

La asignación estructural del aminotriol **62** se realizó en función de sus datos espectroscópicos (Figura 2.3.3.3.1).¹⁵¹

¹⁴⁹ Para condiciones generales ver: Greene, T. W.; Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: Hoboken, 2007. pp.356-360. Para desprotecciones con TBAF ver: (a) Zhang, H.; Markadieu, N.; Beauwens, R.; Erneux, C.; Prestwich, G. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 51, 16464-16465. (b) Hagen, M. D.; Happ, C. S.; Chládek, S. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5040-5045. (c) Li, M.; Wub, A.; Zhoub. P. *Tetrahedron Letters* **2006**, *47*, 3707-3710. En estos casos, los grupos ester pueden migrar debido a la naturaleza básica del ión fluoruro. Para evitar la migración se utilizan un medio ligeramente ácido como ácido acético (Yamada, H.; Tanigakiuchi, K.; Nagao, K.; Okajima, K.; Lipshutz, M. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 5615-5618) o Pyr·HCl.

¹⁵⁰ V. Varaprasad, C.; Haberte, D.; S. Ramasamy, K. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13345-13368.

¹⁵¹ La asignación de las señales de RMN del aminotriol **62** está apoyada en los experimentos bidimensionales: NOESY, COSY, HSQC y HMBC.

¹³C-RMN del aminotriol **62**.

En el espectro de ^1H -RMN, la señal situada a 4.58 ppm, que integra para un protón, se asignó al protón del alcohol que está sobre el C-2. El multiplete situado a 4.13-4.05 ppm, que integra para tres protones, se asignó al protón del alcohol que se encuentra sobre el carbono C-3, al protón H-3 y al protón del alcohol de la cadena axial situada sobre el carbono C-1.

En el espectro de ^{13}C -RMN, se observó a 58.6 ppm la señal asignada al carbono metilénico que soporta el grupo hidroxilo, mientras que la señal del carbono contiguo aparece a 36.0 ppm. Por otro lado, se observan todas las señales de los carbonos del anillo ciclohexánico, apareciendo C-4 a 84.5 ppm, C-2 a 72.9 ppm, C-3 a 70.8 ppm, C-1 a 65.5 ppm, C-5 a 36.5 ppm, C-6 a 33.2 ppm, junto con la señal asignada al carbono C-7 a 68.0 ppm. La señal que aparece a 121.9 ppm se asignó al carbono del grupo CN. Finalmente, las señales asignadas a los dos metilos del isopropilideno aparecen a 29.9 y 26.8 ppm, mientras que el carbono cuaternario se muestra a 108.7 ppm.

En el espectro de IR, se observan las bandas de la vibración de tensión características del enlace O-H (3478 y 3410 cm^{-1}).

El espectro de masas *LRMS* (*API-ES*⁺) presenta los picos *m/z* 393 (*M*+*H*)⁺ y 415 (*M*+*Na*)⁺.

La conformación mayoritaria del ciclohexano del aminotriol **62** es una silla ⁴*C*₁. Esto se deduce de las constantes de acoplamiento que presenta el protón H-6_{ax} con H-5'_{ax} (*J*_{anti} = 12.9 Hz) y H-5_{ec} (*J*_{gauche} = 3.5 Hz). Además, el HMBC corrobora esta asignación al observarse correlaciones a tres enlaces del protón H-2_{ec} con los carbonos C-4 y C-6, del protón H-5_{ec} con los carbonos C-1 y C-3, del protón H-5_{ax} con el carbono C-7 y del protón del hidroxilo OH-2 con el carbono C-1.

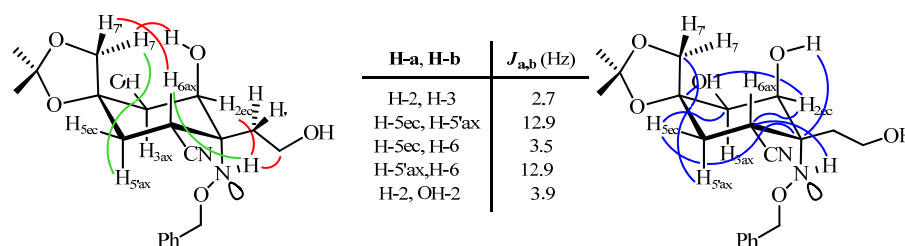


Figura 2.3.3.3.2. Relación de constantes de acoplamiento, acoplamientos HMBC (en color azul), NOESY (color rojo) y COSY (color verde) más significativos del aminotriol **62**.

La configuración relativa del nitrógeno en el aminotriol **62** es *R** (Figura 2.3.3.3.3).

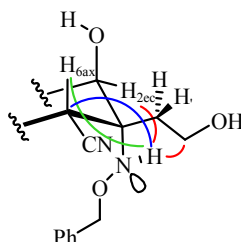
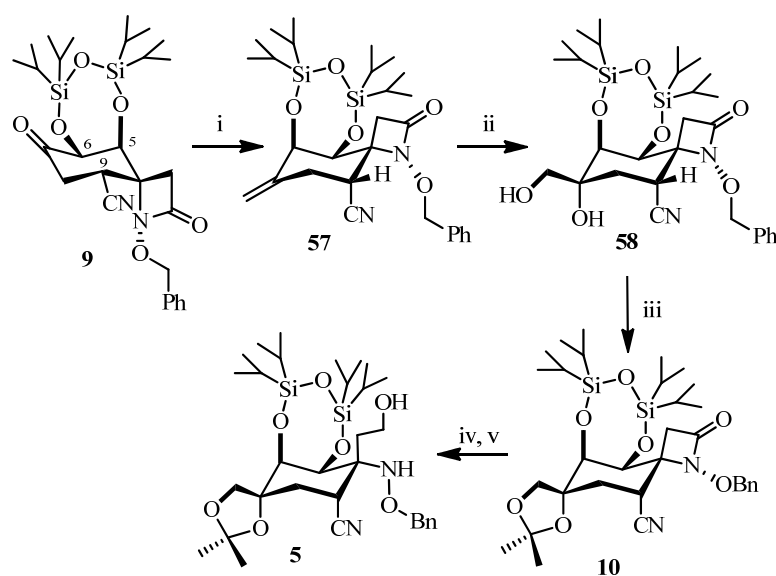


Figura 2.3.3.3.3. Acoplamientos HMBC (en color azul), NOESY (en color rojo) y COSY (color verde) más significativos del protón de la amina.

Esta configuración se deduce de: i) El acoplamiento a larga distancia entre el protón del NH y H-6ax observada en el experimento COSY, ii) el experimento NOESY, en el que se observa un punto de cruce entre el protón del NH y el protón H-2 y otro entre el protón del NH y los protones del CH₂ contiguos al OH de la cadena del carbono C-1 y iii) el HMBC, en el que se observa correlaciones a tres enlaces del protón del NH y el carbono C-6.

En resumen, el Esquema 2.3.3.3.2 muestra la secuencia sintética para la preparación del aminoalcohol **5** a partir del ciano-β-lactama **8**.



Clave: (i) Me(Ph)₃PBr, *n*-BuLi, THF, -78 °C a t.a.; (ii) RuCl₃·xH₂O, NaIO₄, AcOEt/CH₃CN/H₂O [3:3:1], 0 °C a t.a.; (iii) DMP, *p*-TsOH, acetona 0 °C a t.a.; iv) DIBAL, THF 0 °C a t.a.; v) NaBH₄, MeOH, 0 °C a t.a.

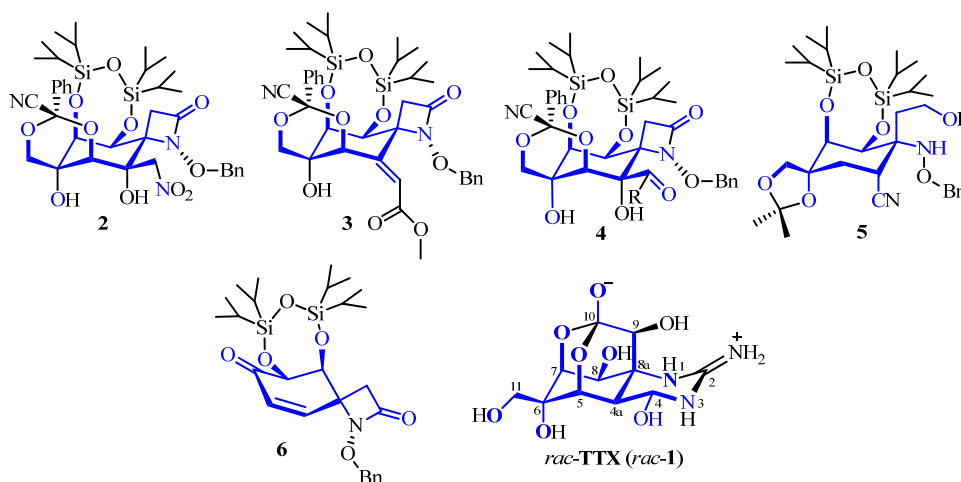
Esquema 2.3.3.3.2. Esquema sintético para la preparación del aminoalcohol **5**.

CONCLUSIONES

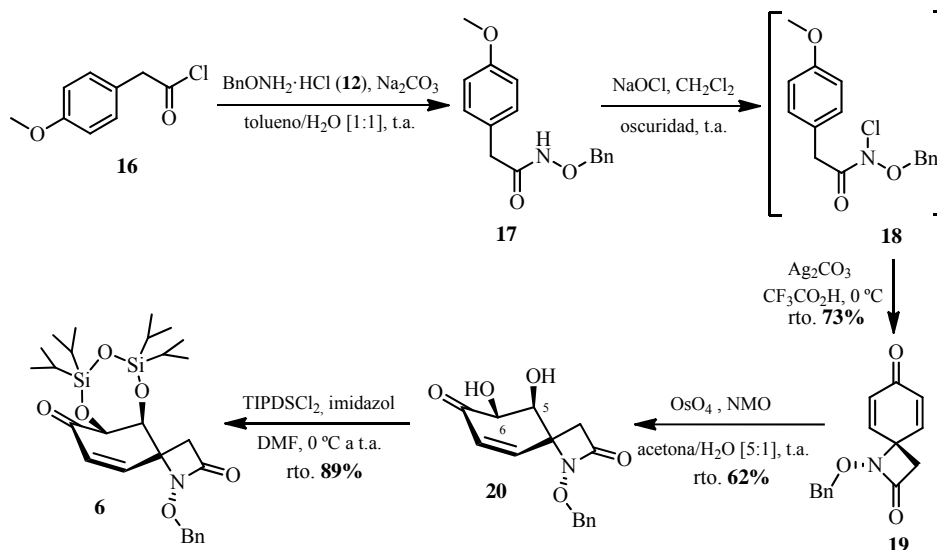
CONCLUSIONES

1. Se ha realizado un estudio de mercado de la tetrodotoxina y de sus análogos. Dentro de los mercados de orientación civil, cabe destacar el mercado de la salud, donde los isótopos estables están jugando un papel cada vez más importante en el desarrollo de técnicas y tecnologías aplicadas a la industria farmacéutica y cosmética. Por su parte, en el ámbito de la industria orientada a la seguridad y la defensa, el empleo de isótopos estables en sistemas de codificación y trazabilidad se está convirtiendo en una herramienta poderosa y decisiva para la identificación de sustancias, así como en la lucha contra la falsificación y el fraude derivado del comercio y uso ilegal.

2. La síntesis de los análogos del *core* de *rac*-tetrodotoxina (nitroalcohol **2**, alqueniléster **3**, α -cetoéster **4** y aminoalcohol **5**) se ha llevado a cabo a partir de la ciclohexenona **6**, cuyo esqueleto carbonado es precursor de ocho (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9 y C-10) de los once carbonos presentes en *rac*-TTX y con las posiciones C-7(*S**) y C-8(*S**) oxigenadas en *anti* al nitrógeno N-1, tal como se encuentran en *rac*-TTX.



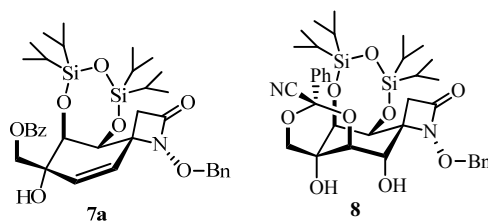
La ciclohexenona **6**, producto de partida de los análogos del *core* de *rac*-tetrodotoxina sintetizados, se preparó a partir de productos comerciales y baratos de acuerdo al esquema sintético siguiente.



La preparación del nitroalcohol **2**, del alqueniléster **3** y del α -cetoéster **4**, se llevó a cabo mediante el desarrollo de la ruta sintética A. Por su parte, la preparación del aminoalcohol **5** se llevó a cabo mediante el desarrollo de la ruta sintética B.

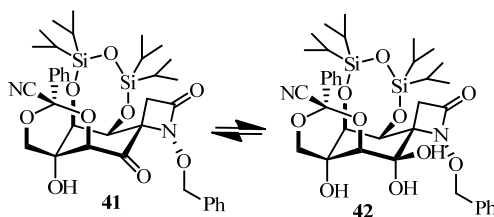
Ruta A: Incorporación temprana del carbono C-11 y posterior del carbono C-4 (ruta A, Esquema I, *Plan de Trabajo*).

A partir de la ciclohexenona **6**, se introdujo de forma estereocontrolada, el carbono convenientemente oxigenado C-11 y el grupo hidroxilo de C-6(*R**), mediante una secuencia que implicó una reacción de Wittig, dihidroxilación regioselectiva del dieno resultante y posterior protección del alcohol primario. El benzoato **7a** presenta, por su parte nueve (C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos de *rac*-TTX.

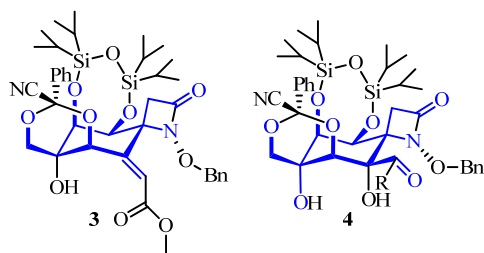


La preparación del cianobenciliden acetal **8** se realizó mediante una secuencia que implica dos etapas: i) epoxidación diastereoselectiva del benzoato **7a** y ii) apertura intramolecular regioselectiva del epóxido. De esta manera, se consiguió la introducción regioselectiva de un grupo hidroxilo en C-4a y el control configuracional del grupo hidroxilo en C-5(*S**). La posterior transformación del grupo hidroxilo en C-4a a cetona (cianobencilidenona **41**), abre nuevos caminos para la incorporación del futuro carbono C-4 de la *rac*-TTX (*rac*-**1**).

Subruta A1: Implicó la reacción nitroaldólica sobre la cianobencilidenona **41**, que conduce a la directa formación del análogo del *core* de *rac*-tetrodotoxina, el nitroalcohol **2**.



Subruta A2: Implicó una reacción de Wittig sobre la cianobencilidenona **41**, para conducir directamente a la formación del análogo del *core* de *rac*-tetrodotoxina, el alqueniléster **3** o por la posterior secuencia de dihidroxilación y oxidación del correspondiente alcohol secundario, α -cetoéster **4**.

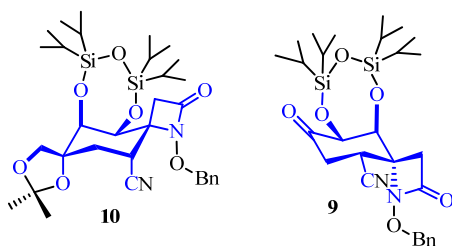


Los compuestos **2**, **3** y **4** poseen un esqueleto carbonado que coincide en diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10 y C-11) de los once carbonos presentes en la TTX y contienen, con la disposición estereoquímica adecuada, la funcionalidad propia de ésta.

Ruta B: Incorporación del carbono C-4 y posterior introducción del carbono C-11 (ruta B, Esquema I, *Plan de Trabajo*).

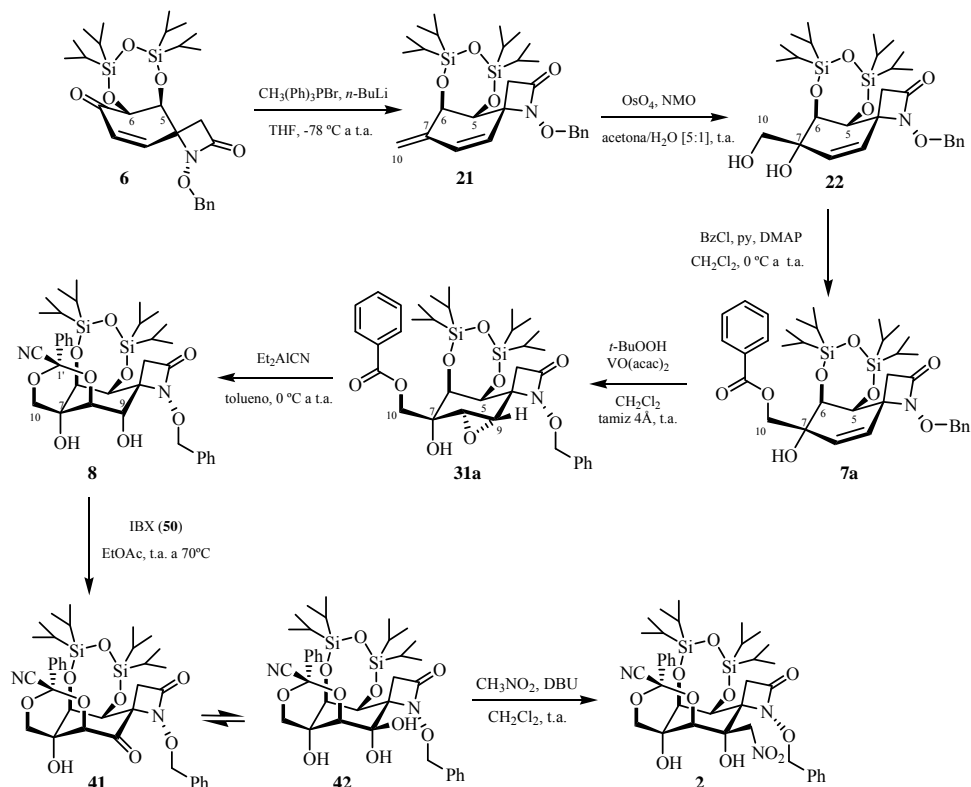
La incorporación temprana del carbono C-4 se llevará a cabo a partir de la ciclohexenona **6**, mediante la adición ($A_{1,4}$) de cianuro para dar lugar a la ciano- β -lactama **9**.

El cianodimetilacetal **10**, que presenta las futuras posiciones C-6 y C-11 de la TTX convenientemente oxigenadas y protegidas como su dimetilacetal derivado, se preparará a partir de la ciano- β -lactama **9** mediante una secuencia que implica: i) reacción de Wittig y ii) dihidroxilación regio- y diastereoselectiva del dieno resultante y posterior formación del correspondiente acetal.

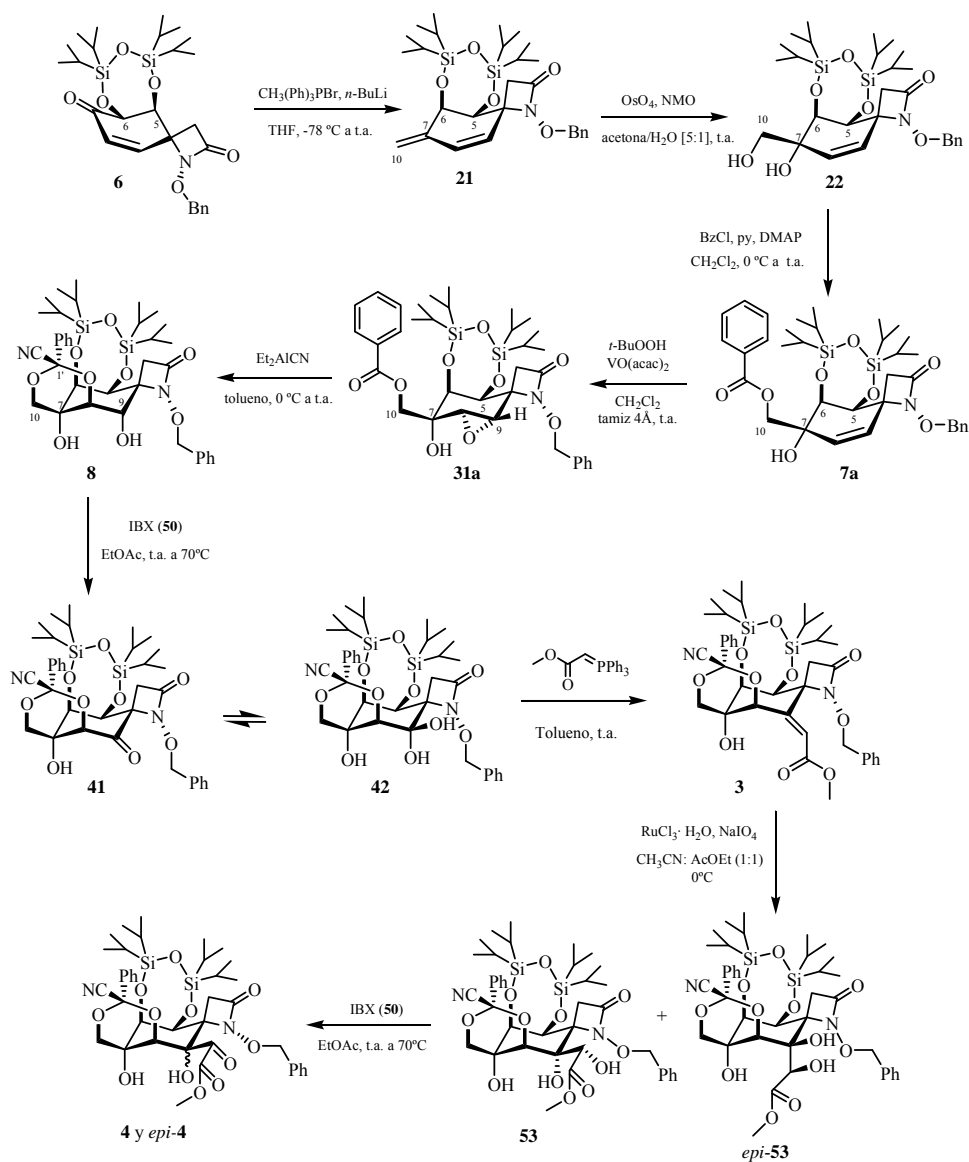


La apertura reductora de la función β -lactama del cianodimetilacetal **10** dará lugar al correspondiente aldehído, cuya posterior reducción conducirá al cianoaminoalcohol **5**, que posee un esqueleto carbonado que contiene diez (C-4, C-4a, C-5, C-6, C-7, C-8, C-8a, C-9, C-10, C-11) de los once carbonos presentes en la TTX.

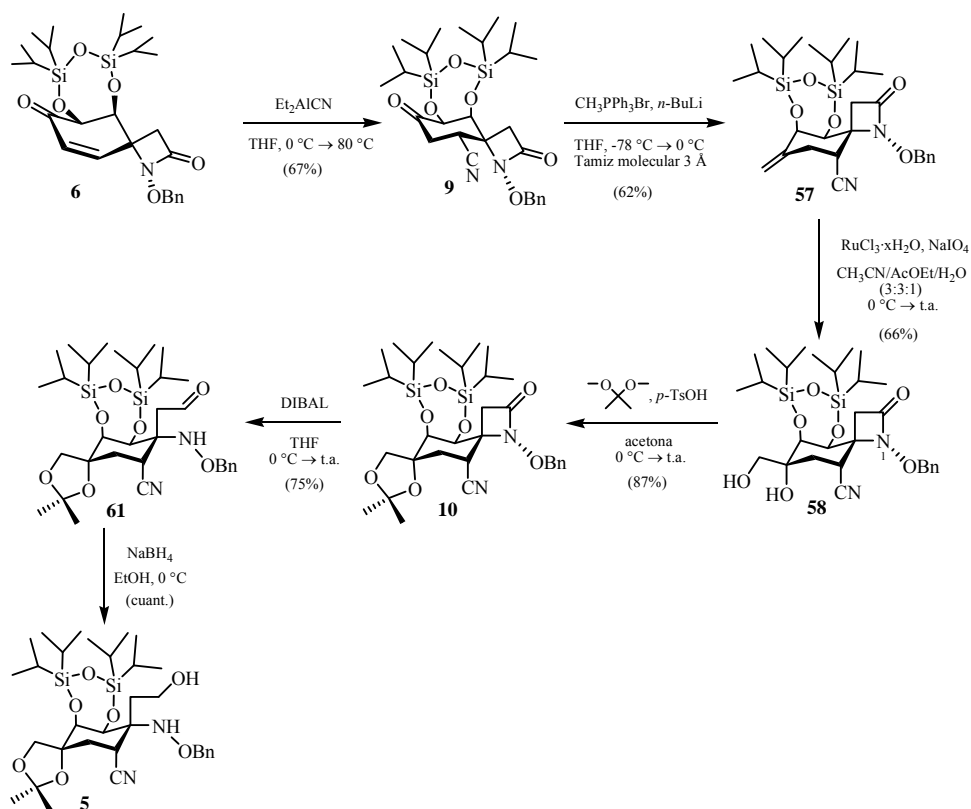
3. El esquema sintético para la preparación del nitroalcohol **2** es el que se muestra a continuación.



4. El esquema sintético para la preparación del alquenciléster **3** y el α -cetoéster **4** es el que se muestra a continuación.



5. El esquema sintético para la preparación del cianoalcohol **5** es el que se muestra a continuación.



6. A partir de productos asequibles, comerciales y baratos, se ha desarrollado la preparación de cuatro análogos del *core* de la tetrodotoxina (compuestos **2-5**) mediante dos estrategias sintéticas (rutas A y B) concretadas en tres esquemas sintéticos que explicitan la metodología sintética requerida.

Los tres esquemas sintéticos presentan un número muy reducido de etapas en comparación con los hasta ahora desarrollados por otros grupos de investigación para análogos del *core* de la tetrodotoxina de similar complejidad estructural y que posteriormente hayan sido transformados con éxito en tetrodotoxina.

La propiedad industrial del contenido de la presente tesis doctoral ha sido protegida mediante los correspondientes documentos de patentes (Anexo C).

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Disolventes y Reactivos

Todas las reacciones fueron realizadas bajo atmósfera de argón, excepto las indicadas en cada caso. Los reactivos y disolventes utilizados provienen de las casas comerciales *Aldrich*, *Fluka*, *Merck*, *Sigma*, *Acros*, *Lancaster*, *SDS* o *Scharlau* y cuando fue necesario fueron purificados por procedimientos habituales.¹

Los siguientes disolventes fueron destilados y secados bajo atmósfera de argón como se indica a continuación: CH₂Cl₂, tolueno, benceno, DMSO y DMF sobre CaH₂ (adicionalmente se utilizó benceno y DMF comercializados secos por *Aldrich* y *Fluka*, respectivamente); THF (presecado sobre KOH) y Et₂O sobre Na/benzofenona; CH₃CN, EtOH y MeOH sobre tamiz molecular de 4 Å de diámetro de poro previamente activado.

Como fuente de NaOCl se utilizó la lejía comercial *Mavy*[®] (con <5% p/v de NaOCl). La *Celita* utilizada fue *Celita-545* de la casa comercial *SDS*. La Et₃N, *i*-Pr₂EtN, *i*-Pr₂NH y piridina se destilaron sobre CaH₂ bajo atmósfera de argón. El *m*-CPBA, comercializado al 57-80% en peso por *Aldrich*, se utilizó considerando que su pureza era del 57%. El NaH (al 60% en aceite mineral) fue lavado dos veces con hexano, bajo atmósfera de argón, inmediatamente antes de ser utilizado. El CDCl₃ empleado en RMN fue filtrado a través de Al₂O₃ básica *150 Merck* (tipo T, 0.063-0.200 mm) cuando la muestra a analizar era presumiblemente sensible a un ligero medio ácido.

B. Procedimientos Generales

La purificación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en

¹ Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. *Purification of Laboratory Chemicals*; Sixth Edition. Butterworth-Heinemann: Oxford, 2009.

columna bajo presión (cromatografía flash),² utilizando como fase estacionaria gel de sílice *60 Merck* (con un tamaño de partícula 230-400 *mesh*) y como fase móvil disolventes previamente destilados. El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones de la mezcla de disolventes utilizadas son siempre volumen/volumen.

El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) empleando cromatofolios de gel de sílice *60F₂₅₄ Merck*, con soporte de aluminio, en capas de 0.2 mm de espesor. El revelado de las placas se realizó con: vapores de yodo, vapores de amoníaco, disolución de 2,4-dinitrofenilhidracina al 2% en EtOH (con un 0.04% en volumen de H₂SO₄ 97%), disolución de ácido fosfomolibdico al 10% en EtOH y visor de luz UV (254 y 366 nm).

El tamiz molecular de 4 Å de diámetro de poro en perlas (*Aldrich*) se activó previamente a su utilización, calentándolo a 150 °C durante 24 h, para después dejarlo enfriar pasando una corriente de argón.

C. Técnicas y Aparatos

• Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ¹H y carbono ¹³C (completamente desacoplados) se realizaron a temperatura ambiente en el disolvente indicado en cada caso (CDCl₃, C₆D₆, CD₃OD y CO(CD₃)), empleando los siguientes aparatos: *Varian Gemini-200* (¹H a 200 MHz y ¹³C a 50 MHz), *Varian INOVA-300* (¹H a 300 MHz y ¹³C a 75 MHz), *Bruker Avance-300* (¹H a 300 MHz y ¹³C a 75 MHz), *Varian Mercury Plus-400* (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz), *Varian INOVA-400* (¹H a 400 MHz y ¹³C a 100 MHz) y *Varian INOVA-500* (¹H a 500 MHz y ¹³C a 125 MHz). Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (δ, ppm), utilizando como referencia interna la señal

² Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.

residual del disolvente: CDCl_3 , 7.26 ppm (^1H -RMN) y 77.0 ppm (^{13}C -RMN); C_6D_6 , 7.15 ppm (^1H -RMN) y 128.0 ppm (^{13}C -RMN); CD_3OD , 3.31 ppm (^1H -RMN) y 49.0 ppm (^{13}C -RMN); $\text{CO}(\text{CD}_3)_2$ 2.05 ppm (^1H -RMN) y 206.7 / 29.9 ppm (^{13}C -RMN).

Los espectros de protón se describen indicando el número de protones y la multiplicidad aparente de cada señal. Las constantes de acoplamiento (J) son las aparentes y se expresan en Hz. Se han empleado las siguientes abreviaturas: s (singlete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), q (quintuplete), sx (sextuplete), h (heptuplete) y m (multiplete). Para las señales con apariencia de doblete de multipletes (dm), triplete de multipletes (tm) y doble doblete de multipletes (ddm) sólo se apuntan las constantes de acoplamiento medibles. Los desplazamientos químicos indicados para los sistemas AB (*sist. AB*) se calcularon promediando los desplazamientos de cada una de las partes del sistema, es decir, en la mitad de la *parte A* y en la mitad de la *parte B*, asignando la letra *A* al núcleo que resuena a campo más bajo. Para los multipletes simétricos y singletes anchos se dará el desplazamiento químico del centro de la señal. Siempre que no se indique lo contrario, los protones diastereotópicos de los centros proquirales se nombrarán como H y H', designando con H' al núcleo más apantallado.

En los espectros de carbono, con objeto de facilitar el seguimiento de la *Discusión de Resultados* de la parte teórica, se muestra únicamente la asignación de las señales más significativas, es decir, aquellas que corresponderán al esqueleto carbonado de las moléculas finales. Cuando la diferencia entre los desplazamientos químicos de dos carbonos es menor de 0.1 ppm, estos se indican con dos cifras decimales aproximando sus valores en fracciones de 0.05 ppm.

Todas las asignaciones están apoyadas por técnicas de doble resonancia³ y

³ Concretamente, se realizaron experimentos de desacoplamiento homonuclear selectivo de espín, irradiando la muestra con un segundo campo de radiofrecuencia exactamente en la posición de

experimentos bidimensionales. Los siguientes acrónimos serán empleados para nombrar experimentos de RMN con secuencia de pulsos menos usuales: COSY (*Correlated Spectroscopy*), DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*), HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), NOE (*Nuclear Overhauser Effect*), NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) y TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*).

- **Puntos de Fusión**

Los puntos de fusión (P.f.) se midieron en un microscopio *Kofler* marca *Reichert*.

- **Espectroscopia de Infrarrojo**

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron con los espectrofotómetros *Perkin-Elmer* modelos 681 y *FT-IR Spectrum One*, y las frecuencias (ν) de los máximos de absorción se expresan en cm^{-1} . Las muestras se analizaron como películas entre cristales de NaCl (film) o en pastillas de KBr.

- **Espectroscopia Ultravioleta-Visible**

Los espectros de ultravioleta-visible (UV) se registraron con los espectrofotómetros *Perkin-Elmer* modelos 402 o *Lambda 2*, en el disolvente que se indica en cada caso. Las longitudes de onda de los máximos de absorción (λ_{max}) se expresan en nm y los valores entre paréntesis corresponden a los coeficientes de extinción (ϵ).

resonancia del núcleo o grupo de núcleos equivalentes seleccionado (habitualmente señales de ^1H -RMN). Para una discusión general sobre métodos y aplicaciones de técnicas de doble RMN, ver: (a) Lambert, J.B.; Mazzola, E.P. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*; Pearson Education Inc.: New Jersey, 2004; p. 131-171 (b) von Philipsborn, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1971**, *10*, 472-490.

- ***Espectrometría de Masas***

Los espectros de masas de baja resolución (*LRMS*) se registraron en: a) un espectrómetro *Hewlett Packard 5973 MSD* por inyección directa de la muestra, usando la técnica de ionización por impacto electrónico (*EI*) con una energía de ionización de 70 eV; o b) un espectrómetro *Hewlett Packard LCMS 1100 MSD* (analizador cuadrupolar acoplado a un HPLC) usando las técnicas de ionización química a presión atmosférica (*APCI*) o ionización química por electroespray (*API-ES*) en sus modos positivo o negativo, aplicando un voltaje capilar de 4000 V, una temperatura de secado de 330 °C y usando como portador una mezcla [1:1] H₂O/MeOH con 1% AcOH (excepto en los casos indicados). Los datos obtenidos están expresados en unidades de masa (*m/z*) y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas respecto al pico base (100%). Se especifica el pico molecular como M⁺.

- ***Análisis Elemental***

Los análisis elementales (A.E.) se efectuaron en el Departamento de Análisis Instrumental del Instituto de Química Orgánica General (C.S.I.C.) con los analizadores *Perkin-Elmer 240C* y *Heraeus CHN-O-Rapid*. Los datos calculados y observados se expresan en tantos por ciento.

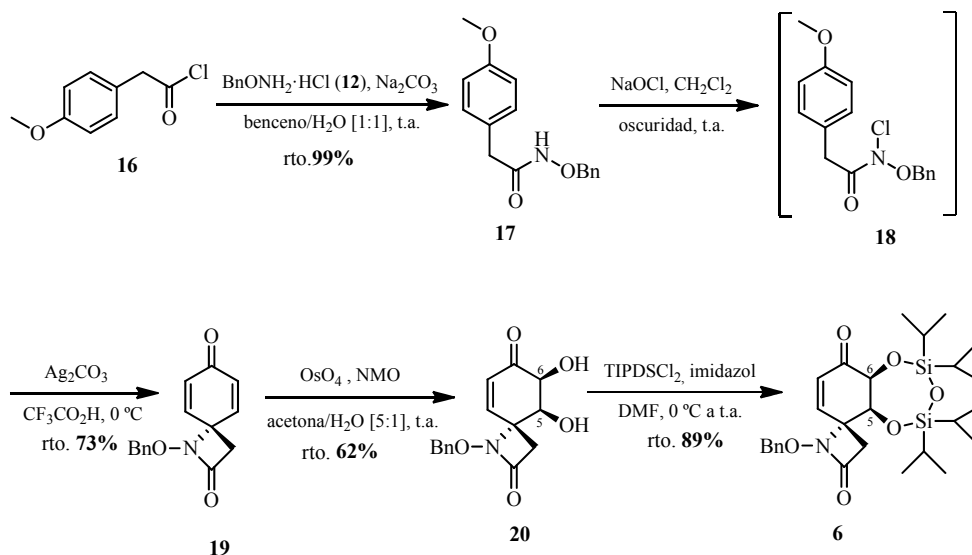
- ***Difracción de Rayos X***

Los espectros de difracción de rayos X se realizaron en el Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Depósitos Minerales de la Universidad de Barcelona y en la Unidad de Investigación de Polimorfismo del Instituto Catalán de Investigación Química de Tarragona, con los difractómetros *Enraf-Nonius CAD4*, *MarResearch MAR345 Image Plate Detector* o *Bruker-Nonius* (indicado en cada caso) empleando radiación MoK α . Las estructuras fueron resueltas utilizando los programas *SHELXL-97* y *SHELXSTL v.6.10*

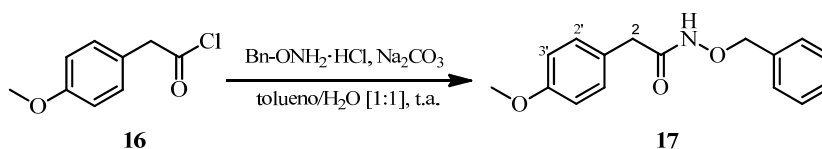
1. SÍNTESIS DE ANÁLOGOS DEL CORE DE TETRODOTOXINA

1.1 Síntesis del producto de partida de las dos rutas:

Síntesis de la ciclohexenona-espiro-β-lactama 6



1.1.1. Síntesis de N-(benciloxi)-2-(4-metoxifenil)acetamida (17)⁴



A una suspensión del clorhidrato de la *N*-alcoxiamina, (9.70 g, 59.58 mmol) y carbonato sódico (60.87 g, 108.33 mmol) en una mezcla de tolueno/agua ([1:1], 90 ml) se adicionó a 0 °C el cloruro de 2-(4-metoxifenil)acetilo (**16**) (10.00 g, 54.16 mmol). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado este tiempo, se añadió AcOEt (80 ml), se

⁴ Noheda, P.; Bernabé, M.; Maroto, S.; Tabarés, N. Spirolactams and their Synthesis. Patent WO 2005108356, Nov 17, 2005.

separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con AcOEt (2 x 80 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con NaCl sat. (2 x 80 ml), HCl (10%, 2 x 80 ml) y H₂O (2 x 80 ml). Se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose la correspondiente *N*-benciloxi-2-(4-metoxifenil) acetamida (**17**)⁵ (14.55 g, rto. cuant.) como un sólido blanco.

P.f.: 98-99 °C.

R_f = 0.40 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.29 (TLC, hexano/tolueno/acetona, 1:2:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):⁶ δ 9.45* (1H, s ancho, NH), 7.29 (5H, s ancho, Ph), 7.09 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-2' y H-6'), 6.78 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, H-3' y H-5'), 4.81 (2H, s, OCH₂Ph), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.29 (2H, s, COCH₂).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 168.9, 158.5, 135.0, 130.0, 129.0, 128.4, 128.3, 126.0, 113.9, 77.8, 55.0, 39.3.

IR (KBr): ν 3436, 3159, 2965, 2833, 1644, 1611, 1512, 1457, 1377, 1301, 1252, 1177, 1152, 1107, 1059, 1032, 971, 814, 789, 726, 696 cm⁻¹.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 276 nm (1558 l mol⁻¹ cm⁻¹).

LRMS (EI): *m/z* 271 (M⁺, 14), 239 (2), 211 (6), 193 (1), 180 (2), 165 (3), 148 (5), 121 (71), 106 (6), 91 (100), 77 (29).

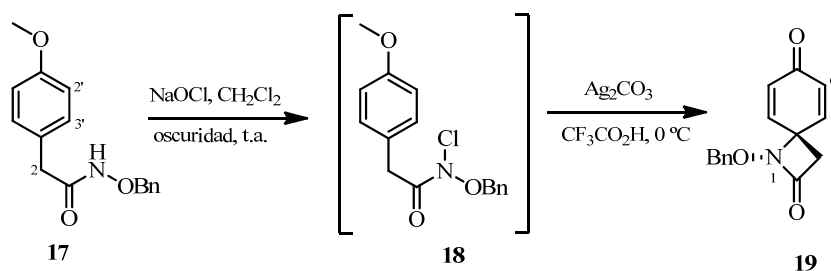
A.E. (C₁₆H₁₇NO₃): Hallado: C, 70.85; H, 6.16; N, 5.14.

Calculado: C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16.

⁵ La *N*-alcoxiámida **17** fue usada directamente en la siguiente reacción sin purificar.

⁶ Cuando el espectro de ¹H-RMN se registra en un espectrómetro a 200 MHz, la señal indicada con el asterisco *, asignada al protón del NH, aparece como un singlete ancho a 7.71 ppm.

1.1.2. Síntesis de *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** y de ciclohexadienona-espiro- β -lactama **19**⁷



A una disolución de *N*-(benciloxi)-2-(4-metoxifenil)acetamida (**17**) (5.00 g, 18.4 mmol), en CH₂Cl₂ (60 ml) se adicionó lentamente en la oscuridad una disolución de hipoclorito sódico (lejía comercial Mavy®)⁸ (38.7 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente en la oscuridad, protegiendo el matraz de reacción con una camisa de papel de aluminio,⁹ hasta que se observó por TLC la desaparición del producto de partida y la formación de la *N*-(benciloxi)-*N*-cloro-2-(4-metoxifenil)acetamida **18** (*R_f* ≈ 0.83, hexano/AcOEt, 1:2), generalmente en 2 horas.¹⁰

A continuación, se adicionó a 0 °C y en ausencia de luz, una disolución de carbonato de plata (10.2 g, 36.9 mmol) en ácido trifluoracético (75 ml) y se agitó

⁷ Los datos de difracción de rayos X del compuesto **19** están recogidos en el Anexo A.

⁸ Se usa una disolución de lejía comercial Mavy® que contiene una concentración menor al 5% p/v de hipoclorito sódico. Los mejores resultados se obtienen cuando se utiliza la lejía de una botella recién abierta.

⁹ La fotodescomposición del hipoclorito sódico es más lenta que la del hipoclorito de *terc*-butilo. Esto nos permite trabajar en condiciones de semioscuridad, utilizando luz indirecta, siempre que se proteja el matraz de reacción con una camisa de papel de aluminio.

¹⁰ Aunque no es necesario para llevar a cabo la siguiente reacción, la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18** se puede aislar como un sólido amarillo después de separar las fases en ausencia de luz, desechar la fase acuosa y concentrar a presión reducida la fase orgánica. Cuando se aisló la *N*-cloro-*N*-alcoxiamida **18**, el rendimiento obtenido en la reacción de formación de la espiro- β -lactama **19** fue menor (2.71 g, 58%) y se recuperó una mayor cantidad de la *N*-alcoxiamida **17** (0.31 g, 6%).

vigorosamente durante 2 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se concentró a presión reducida calentando a 35 °C y el residuo obtenido se basificó añadiendo una disolución acuosa de Na₂CO₃ (10%, 75 ml) (si fuese necesario se puede añadir Na₂CO₃ sólido). Se añadió CH₂Cl₂ (50 ml) y la mezcla se filtró a vacío a través de *Celita* para eliminar las sales de plata precipitadas, que se lavaron con CH₂Cl₂ (3 x 50 ml). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 75 ml). La fase orgánica se lavó con NaCl sat. (2 x 150 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó realizando dos cromatografías en columna primero (hexano/AcOEt, 2:1) y después (hexano/tolueno/acetona, 1:7:1), obteniéndose *rac*-(1*R*_N)-1-(benciloxi)-1-azaespiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona (**19**) (3.43 g, 73%) como un sólido blanco, y la N-alcoxi-acetamida de partida **17**.

***rac*-(1*R*_N)-1-(Benciloxi)-1-azaespiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona (**19**)¹¹**

P.f.: 115-116 °C.

R_f = 0.40¹² (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.38 (TLC, hexano/tolueno/acetona, 1:2:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.32 (5H, m, Ph), 6.55 (2H, dm, *J* = 10.2 Hz, H-5 y H-9), 6.17 (2H, dm, *J* = 10.2 Hz, H-6 y H-8), 4.88 (2H, s, OCH₂Ph), 2.89 (2H, s, COCH₂, H-3 y H-3').

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 183.8 (C-7), 162.9 (C-2), 145.0, 134.2, 130.9, 128.7, 128.6, 128.1, 78.7, 60.0 (C-4), 42.9 (C-3).

IR (KBr): ν 3459, 3043, 2963, 1764, 1672, 1630, 1455, 1410, 1375, 1322, 1259, 1206, 1138, 1109, 1056, 961, 886, 841, 768, 737, 696 cm⁻¹.

UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 242 nm (9511 l mol⁻¹ cm⁻¹).

LRMS (EI): *m/z* 255 (M⁺, 1), 197 (41), 121 (6), 106 (16), 91 (100), 78 (25).

¹¹ Los datos de difracción de rayos X del compuesto **19** están recogidos en el *Anexo A*.

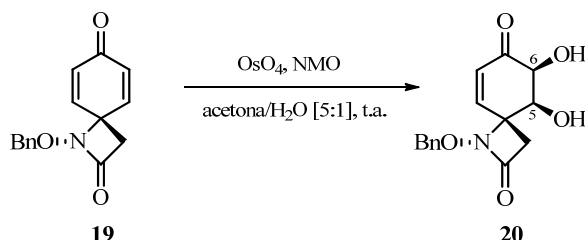
¹² Para distinguir **17** y **19**, que presentan el mismo *R_f* en hexano/AcOEt, la placa de TLC se revela con una disolución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 278 ($M+Na$)⁺, 256 ($M+H$)⁺.

A.E. (C₁₅H₁₃NO₃): Hallado: C, 70.59; H, 4.98; N, 5.55.

Calculado: C, 70.58; H, 5.13; N, 5.49.

1.1.3. Síntesis del 1,2-diol **20**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N)-1-(benciloxi)-1-azaespiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona (**19**) (2.60 g, 10.18 mmol) en acetona (45 ml) se adicionó, secuencialmente y a temperatura ambiente, agua (9 ml), *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (2.71 g, 22.40 mmol) y tetróxido de osmio (2.5% en peso en *t*-BuOH, 7.66 ml, 0.61 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas.¹³ Pasado este tiempo, se añadió una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ (10%, 1.9 ml) y se agitó 15 min. A continuación, la mezcla de reacción se extrajo con Et₂O (7 x 20 ml)¹⁴ y con AcOEt (3 x 20 ml).¹⁵ La fase etérea se secó con la mínima cantidad de MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 1:2)¹⁶

¹³ La reacción se da por terminada en 3 h, a pesar de que pueda quedar algo de sustrato de partida sin reaccionar (usualmente se recuperan pequeñas cantidades de dienona **19**, ~2%), ya que a tiempos más cortos (1 h) el grado de conversión es menor (recuperando mayor cantidad de **19**), y cuando se prolonga el tiempo de reacción (14 h) se observa la desaparición del diol **20** generado.

¹⁴ La mezcla de reacción se extrae con Et₂O hasta que no se observa por TLC el diol **20**.

¹⁵ El extracto de AcOEt se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniendo un residuo marrón (TLC, R_f = 0.26, AcOEt), no identificado.

¹⁶ Finalmente, se completa la elución del diol **20** pasando AcOEt por la columna cromatográfica.

obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**20**) (1.87 g, rto. 62%) como un sólido blanco.

P.f.: 155-157 °C.

R_f = 0.52 (TLC, AcOEt).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.20 (5H, m, Ph), 6.21 (1H, dd, *J* = 10.0, 2.1 Hz, H-9), 5.92 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-8), 5.02 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.3 Hz, OCH₂Ph), 4.91 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.3 Hz, OCH₂Ph), 4.43 (1H, d, *J* = 3.1 Hz, H-6), 4.18 (1H, t, *J* = 2.6 Hz, H-5), 3.62 (1H, s ancho, OH), 3.14 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.6 Hz, H-3), 2.73 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.6, H-3'), 2.70 (1H, s ancho, OH).

¹H-RMN (300 MHz, CD₃OD): δ 7.37 (5H, m, Ph), 6.50 (1H, dd, *J* = 10.0, 1.2 Hz, H-9), 5.87 (1H, d, *J* = 10.0 Hz, H-8), 5.02 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 4.92 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 4.37 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-6), 4.12 (1H, dd, *J* = 2.9, 1.2 Hz, H-5), 3.14 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.4 Hz, H-3), 2.75 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.4, H-3').

¹³C-RMN (75 MHz, CD₃OD): δ 198.8 (C-7), 166.9 (C-2), 146.6 (C-9), 136.6, 131.1 (C-8), 131.0, 130.4, 129.9, 129.6, 80.7, 76.0 (C-6), 74.0 (C-5), 67.2, 43.2.

IR (KBr): ν 3429, 2989, 2950, 1772, 1692, 1631, 1450, 1382, 1211, 1119, 1053, 767, 698 cm⁻¹.

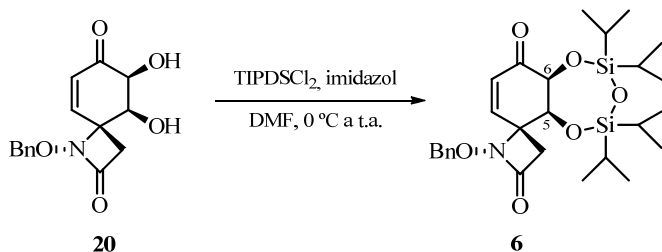
LRMS (API-ES⁺): *m/z* 312 (M+Na)⁺, 290 (M+H)⁺, 272 (M-17)⁺.

A.E. (C₁₅H₁₅NO₅): Hallado: C, 62.31; H, 5.33; N, 4.98.

Calculado: C, 62.28; H, 5.23; N, 4.84.

1.1.4. Protección del diol **20**

1.1.4.1. Protección simultánea con el grupo bifuncional TIPDS



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**20**) (200 mg, 0.691 mmol) e imidazol (207 mg, 3.040 mmol) en DMF (2.7 ml) se adicionó a 0 °C 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (251 µl, 0.760 mmol).¹⁷ La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Pasado este tiempo, se añadió H₂O (3 ml) y AcOEt (3 ml), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con CuSO₄ sat. (3 ml) y NaCl sat. (2 x 3 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 6:1)¹⁸ obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**6**) (327 mg, rto. 89%) como un sólido blanco.

P.f.: 57-59 °C.

¹⁷ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, **1999**; p. 239-241. (b) Para la primera utilización de TIPDSCl₂ como grupo protector de dioles, ver: Markiewicz, W.T. *J. Chem. Res. Synop.* **1979**, 24-25. (c) Como ejemplo de protección de dioles cíclicos, ver: Schaumberg, J.P.; Hokanson, G.C.; French, J.C. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1651-1656.

¹⁸ En algunas ocasiones, cuando el agente sililante no procedía de un lote comercial reciente, se realizó una segunda columna cromatográfica (CH₂Cl₂/Et₂O, 5:1) para separar el derivado sililado **63** (*R*_f = 80) del disilanol TIPDS(OH)₂ (*R*_f = 0.28) que procede de la hidrólisis del TIPDSCl₂.

R_f = 0.49 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.66 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.80 (TLC, CH₂Cl₂/Et₂O, 5:1); 0.38 (TLC, hexano/CH₂Cl₂, 1:15, eluída 3 veces).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.34 (5H, m, Ph), 6.23 (1H, *parte A sist. AB*, J = 10.2 Hz, H-9), 5.82 (1H, *parte B sist. AB*, J = 10.2 Hz, H-8), 4.98 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.94 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.65 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-6), 4.44 (1H, d, J = 2.9 Hz, H-5), 3.24 (1H, *parte A sist. AB*, J = 14.2 Hz, H-3), 2.57 (1H, *parte B sist. AB*, J = 14.2 Hz, H-3'), 1.11-0.94 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 193.8 (C-7), 164.6 (C-2), 146.6 (C-9), 135.1, 129.2 (C-8), 129.1, 128.6, 128.5, 78.9, 75.6 (C-6), 72.5 (C-5), 65.2 (C-4), 41.4 (C-3), 17.4, 17.3, 17.15, 17.1, 17.0, 16.95, 16.8, 14.0, 13.4, 13.0, 12.9, 12.7.

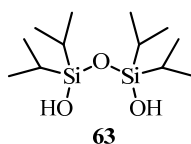
IR (film): ν 2945, 2891, 2867, 1781, 1694, 1464, 1386, 1250, 1172, 1144, 1102, 1060, 998, 940, 885, 816, 750, 697 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1085 (2M+Na)⁺, 554 (M+Na)⁺, 532 (M+H)⁺.

A.E. (C₂₇H₄₁NO₆Si₂): Hallado: C, 61.02; H, 7.80; N, 2.71.

Calculado: C, 60.98; H, 7.77; N, 2.63.

1,1,3,3-Tetraisopropildisiloxano-1,3-diol (63)



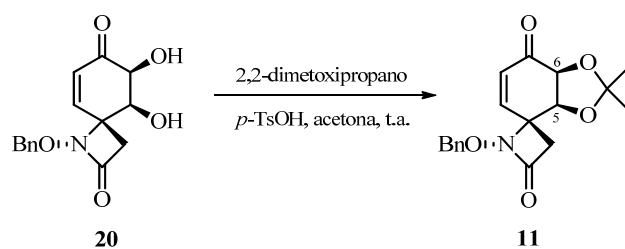
R_f = 0.28 (CH₂Cl₂/Et₂O, 5:1); 0.38 (hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 3.43 (2H, s ancho, 2 x OH), 1.08-0.94 (28H, m, TIPDS).

LRMS (API-ES⁺): m/z 301 (M+Na)⁺, 279 (M+H)⁺.

LRMS (EI): m/z 278 (M⁺, 3), 262 (1), 235 (19), 207 (6), 149 (3), 137 (4), 84 (80), 49 (100).

1.1.4.2. Diprotección simultánea con el grupo bifuncional DMP



A una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**20**) (109 mg, 0.377 mmol) y 2,2-dimetoxipropano (168 μ l, 1.885 mmol) en acetona seca (1 ml), se adicionó una cantidad catalítica de *p*-TsOH (1 mg, 0.005 mmol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas.¹⁹ Pasado este tiempo, se añadió Na₂CO₃ sat. (1 ml) y se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se lavó con NaCl sat. (2 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:2) obteniéndose *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-isopropiliden-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**11**) (52 mg, rto. 42%), como un aceite amarillento, y el diol de partida **20** (53 mg, 49%).

R_f = 0.50 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.27 (5H, m, Ph), 6.29 (1H, dd, J = 10.2, 2.0 Hz, H-9), 5.92 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-8), 4.94 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.86 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.28 (1H, dd, J = 5.2, 2.0 Hz, H-5), 4.12 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-6), 3.18 (1H, *parte A sist. AB*, J = 14.7

¹⁹ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 1999; p. 207-215. (b) Como ejemplo de protección de 1,2-dioles en ciclohexanonas, ver: Koulocheri, S.D.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A-L.; Haroutounian, S.A. *Tetrahedron* **2002**, 58, 6665-6671.

Hz, H-3), 2.79 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.7$ Hz, H-3'), 1.34 (3H, s, CH₃), 1.28 (3H, s, CH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 194.4, 164.9, 143.8 (C-9), 134.7, 130.8 (C-8), 129.8, 129.6, 128.9, 110.1, 79.6, 77.4 (C-5), 74.4 (C-6), 60.8, 43.5, 27.1, 25.8.

IR (film): ν 2985, 2935, 1781, 1688, 1454, 1375, 1227, 1158, 1086, 1050, 981, 887, 847, 750, 695 cm⁻¹.

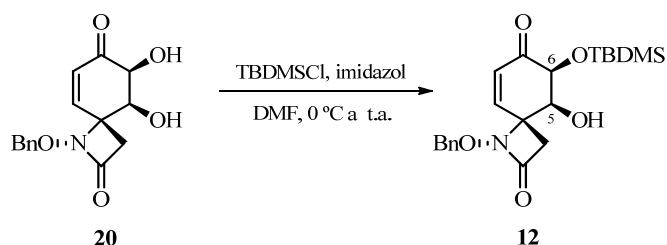
LRMS (API-ES⁺): m/z 681 (2M+Na)⁺, 375 (M+2Na)⁺, 352 (M+Na)⁺, 330 (M+H)⁺.

A.E. (C₁₈H₁₉NO₅): Hallado: C, 65.71; H, 5.94; N, 4.41.

Calculado: C, 65.64; H, 5.81; N, 4.25.

1.1.4.3. Monoprotección selectiva del diol **20**²⁰

Método A



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**20**) (1.09 g, 3.46 mmol) e imidazol (282 mg, 4.15 mmol) en DMF (5 ml) se adicionó a 0 °C una disolución de cloruro de *terc*-butildimetilsililo (645 mg, 4.15 mmol) en DMF (6 ml).²¹ La mezcla se agitó a

²⁰ Los datos de difracción de rayos X del compuesto **12** están recogidos en el Anexo A.

²¹ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 1999; p. 127-132. (b) Como ejemplo de monoprotección selectiva en reacciones de sililación de OH ecuatoriales frente a OH axiales, ver: Rye, C.S.; Withers, S.G. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9756-9767.

temperatura ambiente durante 12 horas.²² Pasado este tiempo, se añadió H₂O (15 ml) y AcOEt (15 ml). Se separaron las fases y la acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con CuSO₄ sat. (2 x 20 ml) y NaCl sat. (2 x 20 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:2) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (1.19 g, rto. 86%),²² como un sólido blanco.

P.f.: 113-114 °C.

R_f = 0.55 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.29 (5H, m, Ph), 6.24 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-9), 5.78 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-8), 5.00 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.87 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.36 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-6), 4.01 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, H-5), 3.25 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.6 Hz, H-3), 2.63 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.6 Hz, H-3'), 2.56 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, OH), 0.85 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.09 (3H, s, SiCH₃), 0.08 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 195.4, 165.5, 145.2 (C-9), 134.9, 129.6 (C-8), 129.5, 129.3, 128.8, 79.3, 75.5 (C-6), 71.7 (C-5), 64.7, 41.9, 25.6, 18.1, -4.9, -5.3.

IR (KBr): ν 3453, 2949, 2929, 2855, 1767, 1682, 1639, 1455, 1256, 1119, 1088, 980, 843, 782, 736 cm⁻¹.

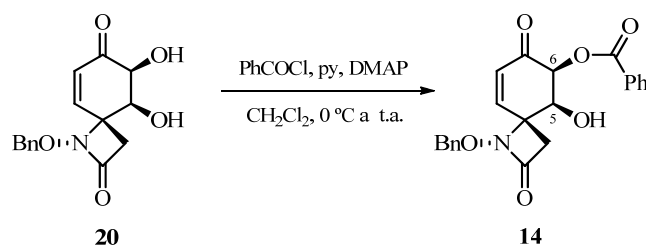
LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 829 (2M+Na)⁺, 426 (M+Na)⁺, 404 (M+H)⁺.

LRMS (*EI*): *m/z* 403 (M⁺, 0.2), 346 (10), 312 (1), 304 (1), 280 (3), 266 (9), 239 (2), 197 (32), 179 (9), 169 (11), 151 (6), 91 (100), 75 (42).

A.E. (C₂₁H₂₉NO₅Si): Hallado: C, 62.59; H, 7.32; N, 3.61.

Calculado: C, 62.50; H, 7.24; N, 3.47.

²² En algunas ocasiones, cuando el agente sililante utilizado no procedía de un lote comercial reciente, fue necesario añadir más cantidad de imidazol (1 equiv.) y TBDMSCl (1 equiv.) para que la reacción se completara.

Método B

A una disolución de *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**20**) (400 mg, 1.383 mmol) en CH₂Cl₂ (13 ml) se adicionó, secuencialmente y a 0 °C, piridina (158 µl, 1.936 mmol), una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (2 mg, 0.016 mmol) y cloruro de benzoilo (195 µl, 1.660 mmol).²³ La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 horas. Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo con Et₂O (3 x 10 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl 10% (10 ml) y NaCl sat. (10 ml), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:7) obteniéndose *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-(benzoiloxi)-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**14**) (446 mg, rto. 82%) como un sólido blanco de aspecto espumoso.

P.f.: 98-99 °C.

R_f = 0.41 (TLC, hexano/AcOEt, 1:2).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (2H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.62 (1H, tm, *J* = 7.6 Hz, Bz), 7.47 (2H, ddm, *J* = 7.6, 7.1 Hz, Bz), 7.50-7.28 (5H, m, Ph), 6.22 (1H, dd, *J* = 10.1, 1.5 Hz, H-9), 5.88 (1H, d, *J* = 10.1 Hz, H-8), 5.87 (1H, d, *J* = 2.7 Hz,

²³ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 1999; p. 173-178. (b) Como ejemplo de monoprotección selectiva en reacciones de acilación de OH ecuatoriales frente a OH axiales, ver: Kozikowski, A.P.; Xia, Y.; Rusnak, J.M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 1301-1303.

H-6), 5.06 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH_2Ph), 4.95 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH_2Ph), 4.25 (1H, dd, $J = 2.7, 1.5$ Hz, H-5), 3.15 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.5$ Hz, H-3), 3.04 (1H, s ancho, OH), 2.73 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.5$ Hz, H-3').

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3): δ 190.9, 165.2, 164.6, 143.8 (C-9), 134.4, 133.5, 130.2 (C-8), 129.9, 129.85, 129.4, 128.8, 128.4, 79.5, 75.3 (C-6), 72.0 (C-5), 64.9, 42.7.

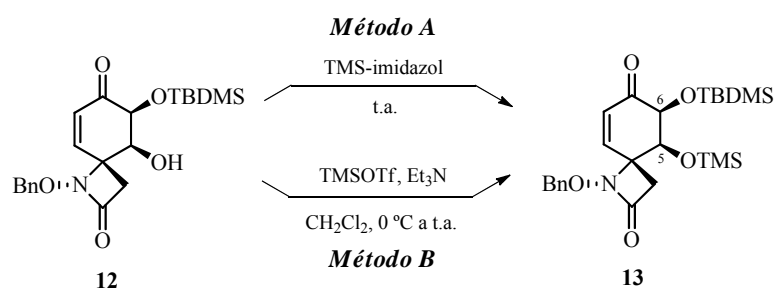
IR (KBr): ν 3434, 3044, 2933, 1768, 1747, 1729 (hombro), 1703, 1627, 1450, 1316, 1272, 1217, 1144, 1106, 1066, 989, 917, 767, 712 cm^{-1} .

LRMS (API-ES $^+$): m/z 809 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 416 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 394 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

A.E. ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_6$): Hallado: C, 67.02; H, 5.08; N, 3.26.

Calculado: C, 67.17; H, 4.87; N, 3.56.

1.1.4.4. Protección del alcohol 12



Método A

Una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (130 mg, 0.322 mmol) en 1-(trimetilsilil)imidazol (0.5 ml, 3.220 mmol) se agitó a temperatura

ambiente durante 16 horas.^{24a} Pasado este tiempo, se añadió una disolución tampón Na₂HPO₄ (0.1 M, 2 ml) y se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con CuSO₄ sat. (1 x 6 ml) y NaCl sat. (2 x 6 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (100 mg, rto. 65%) como un sólido blanco.

Método B

A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (79 mg, 0.196 mmol) y trietilamina (44 µl, 0.314 mmol) en CH₂Cl₂ (0.9 ml) se adicionó a 0 °C triflato de trimetilsililo (54 µl, 0.294 mmol).²⁴ La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado este tiempo, se añadió a 0 °C una disolución tampón Na₂HPO₄ (0.1 M, 2 ml) y AcOEt (2 ml). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (89 mg, rto. 96%)²⁵ como un sólido blanco.

P.f.: 104-105 °C.

²⁴ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, **1999**; p. 116-121. (b) Como ejemplo de protección de hidroxicetonas con TMSOTf, ver: Ley, S.V.; Anderson, J.C.; Blaney, W.M.; Jones, P.S.; Lidert, Z.; Morgan, E.D.; Robinson, N.G.; Santafianos, D.; Simmonds, M.S.J.; Toogood, P.L. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5175-5192.

²⁵ En algunas ocasiones, cuando el TMSOTf utilizado no procede de un lote comercial recién abierto, disminuye el rendimiento al 89% y se puede llegar a aislar el producto de reordenamiento **20** (rto. 4%) cuando se aumenta la escala de reacción (multigramos).

$R_f = 0.47$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (5H, m, Ph), 6.09 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, H-9), 5.68 (1H, dd, $J = 10.3, 1.1$ Hz, H-8), 4.98 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.6$ Hz, OCH_2Ph), 4.84 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.6$ Hz, OCH_2Ph), 4.13 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 4.10 (1H, s ancho, H-6), 3.41 (1H, s ancho, H-3), 2.47 (1H, d, $J = 14.2$ Hz, H-3'), 0.79 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.16 (9H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.08 (3H, s, SiCH_3), 0.00 (3H, s, SiCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 196.0, 165.5, 148.8 (C-9), 135.3, 148.7, 129.3, 129.1, 128.8 (C-8), 128.7, 78.9, 77.4 (C-6), 68.7 (C-5), 65.5, 41.1, 25.5, 18.0, 0.3, -5.1, -5.2.

IR (KBr): ν 3435, 3028, 2955, 2927, 2891, 2855, 1779, 1678, 1471, 1251, 1148, 1103, 979, 942, 883, 848, 778, 744 cm^{-1} .

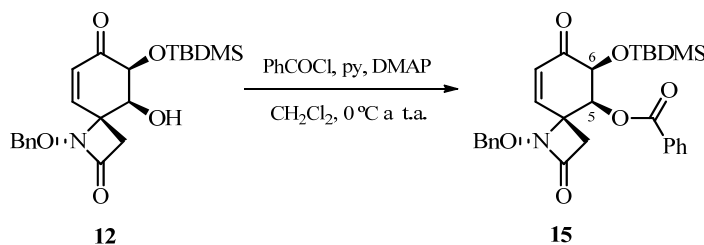
LRMS (*API-ES* $^+$): m/z 973 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 548 ($\text{M}+73$) $^+$, 498 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 476 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

LRMS (*EI*): m/z 475 (M^+ , 3), 460 (2), 418 (21), 384 (5), 368 (4), 354 (6), 340 (4), 324 (7), 309 (13), 269 (43), 179 (24), 147 (34), 91 (100), 73 (57).

A.E. ($\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{NO}_5\text{Si}_2$): Hallado: C, 60.48; H, 7.93; N, 2.89.

Calculado: C, 60.59; H, 7.84; N, 2.94.

Método C



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (100 mg, 0.248 mmol) en CH_2Cl_2 (3.5 ml) se adicionó, secuencialmente y a 0 °C, piridina (28 μl ,

0.347 mmol), una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (0.5 mg, 0.004 mmol) y cloruro de benzoilo (35 μ l, 0.298 mmol).²⁶ La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Para que la reacción se completara fue necesario añadir cada 2 horas piridina (28 μ l, 0.347 mmol), DMAP (0.5 mg, 0.004 mmol) y cloruro de benzoilo (35 μ l, 0.298 mmol), hasta un total de cuatro adiciones, y agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante otras 16 horas. Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo con Et₂O (3 x 3 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (10%, 3 ml) y NaCl sat. (3 ml), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5-(benzoiloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**15**) (118 mg, rto. 94%) como un sólido blanco.

P.f.: 88-89 °C.

R_f = 0.45 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.69 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 8.12 (1H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 8.00 (1H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.63-7.57 (1H, m, Bz), 7.59-7.44 (2H, m, Bz), 7.33 (5H, s, Ph), 6.29 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-9), 5.85 (1H, dd, *J* = 10.2, 1.2 Hz, H-8), 5.55 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-5), 4.91 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, OCH₂Ph), 4.85 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, OCH₂Ph), 4.55 (1H, dd, *J* = 2.7, 1.2 Hz, H-6), 3.58 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.6 Hz, H-3), 2.74 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.6 Hz, H-3'), 0.77 (9H, s, C(CH₃)₃), -0.02 (3H, s, SiCH₃), -0.05 (3H, s, SiCH₃).

²⁶ (a) Greene, T.W.; Wuts, P.G.M. *Protective Groups in Organic Synthesis*; Wiley-Interscience: New York, 1999; p. 173-178. (b) Como ejemplo de protección de una β -hidroxi- α -sililoxicetona cíclica, ver: Caddick, S.; Delisser, V.M.; Doyle, V.E.; Khan, S.; Avent, A.G.; Vile, S. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 2737-2754.

^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 193.6, 165.7, 165.1, 147.0 (C-9), 135.2, 133.7, 130.2, 129.8, 129.4, 129.2, 128.9 (C-8), 128.8, 128.7, 128.5, 79.1, 73.6 (C-6), 70.5 (C-5), 63.4, 42.3, 25.5, 17.9, -5.1, -5.2.

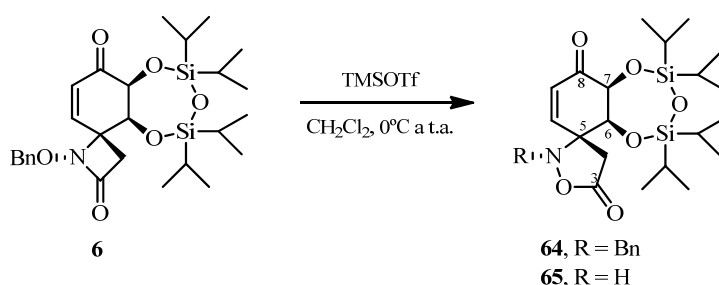
IR (KBr): ν 3435, 3065, 2931, 2855, 1783, 1725, 1687, 1453, 1268, 1217, 1114, 1078, 976, 838, 781, 757, 712 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 530 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 508 ($\text{M}+\text{H}^+$).

A.E. ($\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{Si}$): Hallado: C, 66.32; H, 6.68; N, 2.97.

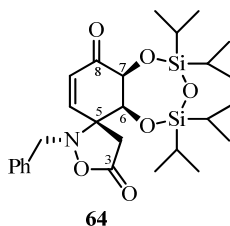
Calculado: C, 66.25; H, 6.55; N, 2.76.

Reordenamiento de la espiro- β -lactama **6** promovido por TMSOTf



A una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**6**) (100 mg, 0.188 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) a 0°C , se añadió triflato de trimetilsililo (41.3 μl , 0.226 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se observó la desaparición del sustrato de partida por TLC (17 h, hexano/ AcOEt , 5:1, eluida 4 veces). A continuación, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/ AcOEt , 6:1) obteniéndose *rac*-(1 R_N ,5 R ,6 S ,7 S)-1-bencil-6,7-dihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxa-1-azaespiro[4.5]dec-9-eno-3,8-diona (**64**) (16 mg, rto. 16%) y *rac*-(1 R_N ,5 R ,6 S ,7 S)-6,7-dihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxa-1-azaespiro[4.5]dec-9-eno-3,8-diona (**65**) (10 mg, rto. 12%), ambos como aceites incoloros.

***rac*-(1*R*_N,5*R*,6*S*,7*S*)-1-Bencil-6,7-dihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxa-1-azaespiro[4.5]dec-9-eno-3,8-diona (64)**



$R_f = 0.50$ (TLC, hexano/AcOEt, 2:1).

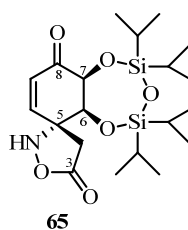
$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (5H, s ancho, Ph), 6.67 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.3$ Hz, H-10), 6.13 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.3$ Hz, H-9), 5.09 (1H, s ancho, H-6 o H-7), 4.54 (1H, s ancho, H-7 o H-6), 4.30 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, NCH_2Ph), 4.10 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, NCH_2Ph), 3.46 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 17.7$ Hz, H-4), 2.91 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 17.7$ Hz, H-4'), 1.26-0.99 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 194.6, 174.2, 135.5, 131.5, 129.4, 129.0, 128.7, 128.4, 77.5, 75.9, 71.3, 58.5, 37.3, 17.8, 17.7, 17.5, 17.4, 17.2, 17.1, 14.4, 13.7, 13.0.

IR (film): ν 3430, 2946, 2890, 2866, 1784, 1718, 1627, 1461, 1251, 1185, 1133, 1009, 923, 886, 749 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1085 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, 554 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 532 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

***rac*-(1*R*_N,5*R*,6*S*,7*S*)-6,7-Dihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxa-1-azaespiro[4.5]dec-9-eno-3,8-diona (65)**



$R_f = 0.25$ (TLC, hexano/AcOEt, 2:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 6.88 (2H, s ancho, NH y H-8 o H-9), 6.14 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-9 o H-8), 4.83-4.72 (1H, s ancho, H-6 o H-7), 4.38 (1H, s ancho, H-7 o H-6), 3.44 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 18.4$ Hz, H-4), 2.67 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 18.4$ Hz, H-4'), 1.26-1.00 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 193.8, 176.7, 137.9, 128.5, 75.4, 67.1, 37.2, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 13.9, 13.2, 12.7, 12.0.

IR (film): ν 3435, 3228, 2947, 2890, 2869, 1793, 1707, 1465, 1251, 1185, 1141, 1095, 1020, 923, 885 cm^{-1} .

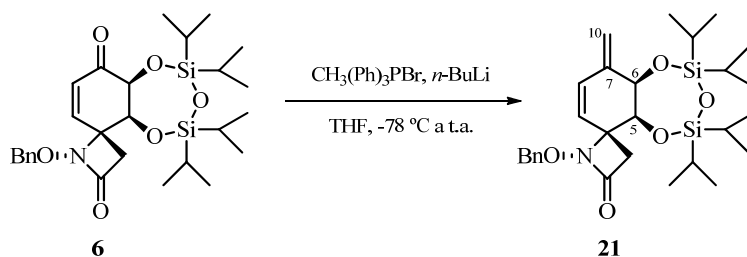
LRMS (*API-ES*⁺): m/z 464 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 442 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

1.2. Ruta A: Síntesis de los análogos del *core* de Tetrodotoxina.

Nitroalcohol 2, alquenciléster 3 y α -cetoéster 4

1.2.1. Síntesis del cianobenciliden acetal 8

1.2.1.1. Síntesis de los dienos conjugados 21 y 25



A una suspensión de bromuro de trifenilmetilfosfonio (177 mg, 0.486 mmol)²⁷ en THF (4.5 ml) se adicionó lentamente, a -78°C , $n\text{-BuLi}$ (1.6 M en hexano, 0.3 ml, 0.486 mmol) y la disolución resultante, de color amarillo brillante, se agitó a esta temperatura durante 15 min. A continuación, se adicionó gota a gota, a -78°C , una disolución de *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-

²⁷ Es conveniente, secar previamente la sal de fosfonio en un desecador, conectado a vacío y provisto de pentóxido de fósforo como agente desecante, durante 24 horas.

5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**6**) (246 mg, 0.463 mmol) en THF (4.5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo, se añadió a 0 °C H₂O (4 ml), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**21**) (166 mg, rto. 68%),²⁸ como un aceite incoloro, la cetona de partida **6** (22 mg, 9%) y el producto de apertura de la β-lactama **24** (20 mg, rto. 9%).

R_f = 0.62 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.28 (5H, m, Ph), 6.13 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, H-8), 5.47 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, H-9), 5.21 (1H, s, H-10), 5.19 (1H, s, H-10'), 5.00 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.0 Hz, OCH₂Ph), 4.95 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.0 Hz, OCH₂Ph), 4.82 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-6), 4.36 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-5), 3.29 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3), 2.41 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3'), 1.16-0.82 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.9 (C-2), 142.1 (C-7), 135.3, 130.2 (C-8), 128.9, 128.65, 128.6 (C-9), 128.4, 118.1 (C-10), 78.7, 73.4 (C-6), 72.2 (C-5), 66.1 (C-4), 40.6 (C-3), 17.6, 17.5, 17.45, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 14.3, 13.2, 13.15, 13.1.

IR (film): ν 3028, 2945, 2867, 1780, 1644 (débil), 1602 (débil), 1464, 1385, 1249, 1143, 1098, 1063, 992, 944, 885, 821, 696 cm⁻¹.

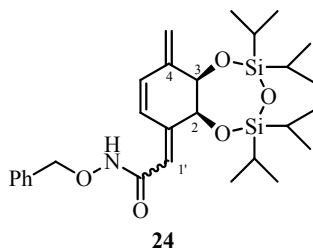
LRMS (API-ES⁺): *m/z* 1081 (2M+Na)⁺, 552 (M+Na)⁺, 530 (M+H)⁺.

²⁸ El rendimiento del dieno **21** depende de la pureza de la sal de fosfonio utilizada y del número de equivalentes de iluro generado.

A.E. (C₂₈H₄₃NO₅Si₂): Hallado: C, 63.47; H, 8.18; N, 2.64.

Calculado: C, 63.26; H, 7.95; N, 2.54.

Mezcla de *rac*-(2*Z*,2*S*,3*R*)-1-{2-[(benciloxi)amino]-2-oxoetiliden}-2,3-dihidroxi-4-metili-den-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)ciclo-hexen-5-eno y *rac*-(2*E*,2*S*,3*R*)-1-{2-[(benciloxi)amino]-2-oxoetiliden}-2,3-dihidroxi-4-metiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)ciclo-hexen-5-eno (24)



$R_f = 0.40$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

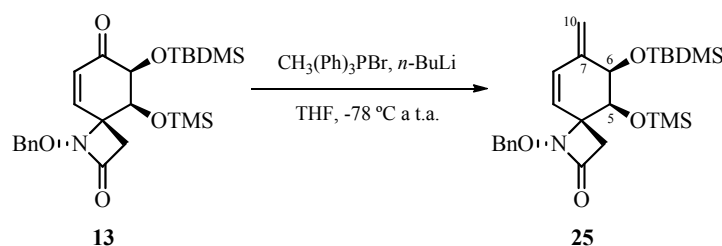
¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.85 (1H, s ancho, NH), 7.47-7.30 (6H, m, Ph y H-5' o H-6'), 6.36 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-6' o H-5'), 5.88 (1H, m, H-2), 5.31 (1H, s ancho, C=CH₂), 5.27 (1H, s ancho, C=CH₂), 4.92 (2H, s ancho, OCH₂Ph), 4.72 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-2' o H-3'), 4.63 (1H, m, H-3' o H-2'), 1.18-0.85 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 135.5, 130.4, 129.8, 129.3, 128.9, 128.6, 128.5, 128.4, 127.6, 127.0, 126.95, 126.6, 79.0, 73.2, 65.3, 57.8, 17.4, 17.2, 17.15, 17.05, 17.0, 13.8, 13.6, 13.5, 13.2, 13.0.

IR (film): ν 3271, 3028, 2945, 2862, 2724, 1739 (hombro), 1652 (ancha), 1464, 1385, 1367, 1248, 1154, 1085, 1060, 1009, 924, 885, 746, 692 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1081 (2M+Na)⁺, 552 (M+Na)⁺, 530 (M+H)⁺.

LRMS (EI): m/z 529 (M⁺, 1), 486 (20), 438 (3), 422 (2), 407 (25), 380 (30), 289 (17), 147 (26), 119 (41), 105 (33), 91 (100), 77 (29).



A una suspensión de bromuro de trifenilmetilfosfonio (185 mg, 0.508 mmol)²⁹ en THF (5 ml) se adicionó lentamente, a -78 °C, *n*-BuLi (1.6 M en hexano, 0.32 ml, 0.508 mmol) y la disolución resultante, de color amarillo brillante, se agitó a esta temperatura durante 15 min.³⁰ A continuación, se adicionó gota a gota, a -78 °C, una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (230 mg, 0.484 mmol) en THF (5 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Pasado este tiempo, se añadió H₂O (4 ml) a 0 °C, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7-metiliden-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**25**) (170 mg, rto. 74%), como un aceite incoloro, la cetona de partida **13** (31 mg, rto. 13%) y una serie de productos secundarios que proceden de la apertura de la β-lactama: la acrilamida **26** (4 mg, rto. 2%), la γ-lactona **27** (9 mg, rto. 4%) y el acrilato **28** (4 mg, rto. 2%).³¹

²⁹ Es conveniente, secar previamente la sal de fosfonio en un desecador, conectado a vacío y provisto de pentóxido de fósforo como agente desecante, durante 24 horas.

³⁰ Como ejemplo de reacción de Wittig de una enona cíclica con metiluro de trifenilfosfonio, ver: Ostrowski, J.; Altenbach, H.-J.; Wischnat, R.; Brauer, D.J. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1104-1110.

³¹ El rendimiento del dieno **25** depende de la pureza de la sal de fosfonio utilizada y del número de equivalentes de iluro generado. Generalmente, al incrementar el número de equivalentes de iluro (0.9-1.5 equiv.), se recupera menos enona de partida **13** (en algunas ocasiones se consume completamente) y aumenta la formación de los productos de apertura de la β-lactama

$R_f = 0.58$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (5H, m, Ph), 5.97 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.0$ Hz, H-8), 5.38 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.0$ Hz, H-9), 5.01 (2H, s ancho, H-10 y H-10'), 4.98 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH_2Ph), 4.87 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH_2Ph), 4.28 (1H, s, H-6), 4.06 (1H, s, H-5), 3.47 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3), 2.28 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3'), 0.80 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.15 (9H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.07 (3H, s, SiCH_3), -0.01 (3H, s, SiCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 166.0, 144.2 (C-7), 135.6, 130.6 (C-9), 129.3 (C-8), 128.8, 128.6, 128.4, 115.6 (C-10), 78.6, 76.1 (C-6), 69.7 (C-5), 66.6 (C-4), 40.3 (C-3), 25.6, 18.0, 0.3, -4.6, -4.8.

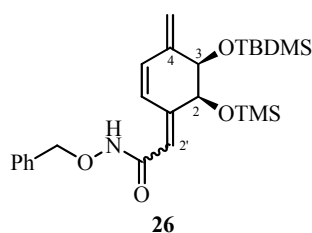
IR (film): ν 3028, 2956, 2927, 2891, 2855, 1779, 1656 (débil), 1611 (débil), 1472, 1367, 1252, 1138, 1101, 988, 944, 925, 883, 840, 776, 694 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 969 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 546 ($\text{M}+73$) $^+$, 496 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 474 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

A.E. ($\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{NO}_4\text{Si}_2$): Hallado: C, 63.50; H, 8.43; N, 3.15.

Calculado: C, 63.38; H, 8.30; N, 2.96.

Mezcla de *rac*-(2*E*,2*S*,3*R*)-1-{2-[(benciloxi)amino]-2-oxoetiliden}-3-[(*terc*-butildimetil-silil)oxi]-4-metiliden-2-[(trimetilsilil)oxi]ciclohex-5-eno y *rac*-(2*Z*,2*S*,3*R*)-1-{2-[(benciloxi)amino]-2-oxoetiliden}-3-[(*terc*-butildimetil-silil)oxi]-4-metiliden-2-[(trimetilsilil)oxi]ciclohex-5-eno (26)



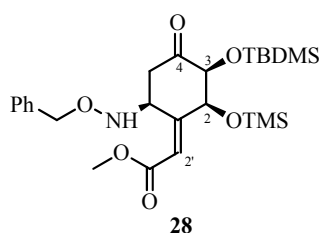
(obteniendo cantidades variables de **26**, **27** y **28**).

$R_f = 0.43$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 7.90 (1H, s ancho, NH), 7.50-7.25 (6H, m, Ph y H-5 o H-6), 6.26 (1H, m, H-6 o H-5), 5.68 (1H, m, H-2'), 5.13 (2H, m, $\text{C}=\text{CH}_2$), 4.93 (2H, s ancho, OCH_2Ph), 4.70 (1H, s ancho, H-2 o H-3), 4.23 (1H, m, H-3 o H-2), 1.05-0.70 (9H, m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.30-0.00 (15H, m, SiCH_3).

LRMS (API-ES^+): m/z 496 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 474 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

rac-(E,2S,3R,6S)-6-[(Benciloxi)amino]-3-[(terc-butildimetilsilil)oxi]-1-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-2-[(trimetilsilil)oxi]-4-oxociclohexan-4-ona (28)



$R_f = 0.37$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

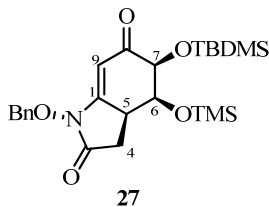
$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 8.34 (1H, s ancho, NH), 7.51-7.22 (5H, m, Ph), 6.09 (1H, t, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 5.05 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH_2Ph), 5.01 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH_2Ph), 4.68 (3H, s, OCH_3), 4.37 (1H, t, $J = 2.6$ Hz, H-2), 3.89 (1H, dd, $J = 3.0, 0.5$ Hz, H-3), 3.87 (1H, dd, $J = 11.0, 7.1$ Hz, H-6), 2.41 (1H, dd, $J = 12.4, 11.0$ Hz, H-5), 2.21 (1H, dd, $J = 12.4, 7.1$ Hz, H-5'), 0.81 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.13 (9H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.05 (3H, s, SiCH_3), -0.03 (3H, s, SiCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 206.1, 171.1, 158.7, 135.7, 130.0, 128.6, 126.9, 120.8 (C-2'), 79.6 (C-3), 78.4, 71.0 (C-2), 65.2, 58.0 (C-6), 39.9 (C-5), 25.5, 18.0, -0.3, -4.7, -5.3.

IR (film): ν 3369, 3029, 2955, 2927, 2891, 2855, 1767 (hombro), 1695, 1638, 1494, 1475, 1454, 1360, 1253, 1159, 1089, 908, 838, 778, 744, 696 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1037 (2M+Na)⁺, 530 (M+Na)⁺, 508 (M+H)⁺, 476 (M-31)⁺.

***rac*-(2*R*_N,5*S*,6*S*,7*S*)-2-(Benciloxi)-7[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-6-[(trimetilsilil)oxi]-2-azabicciclo[4.3.0]non-1(9)-eno-3,8-diona (27)**



R_f = 0.40 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.47-7.32 (5H, m, Ph), 5.54 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-9), 5.09 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, OCH₂Ph), 5.03 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, OCH₂Ph), 4.29 (1H, t, *J* = 2.3 Hz, H-6), 4.21 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-7), 3.23 (1H, tt, *J* = 8.3, 2.3 Hz, H-5), 2.63 (1H, dd, *J* = 16.8, 8.3 Hz, H-4), 2.52 (1H, dd, *J* = 16.8, 8.3 Hz, H-4'), 0.93 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.23 (3H, s, SiCH₃), 0.09 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.06 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 193.8, 169.7, 155.9 (C-1), 133.2, 129.8, 129.5, 128.7, 99.7 (C-9), 78.7 (C-7), 77.9, 73.9 (C-6), 37.7 (C-5), 28.5 (C-4), 26.1, 18.8, 0.6, -4.2, -5.5.

IR (film): ν 3028, 2954, 2927, 2891, 2856, 1759, 1681, 1498, 1471, 1361, 1293, 1250, 1218, 1163, 1117, 1073, 1030, 977, 907, 839, 781, 753 cm⁻¹.

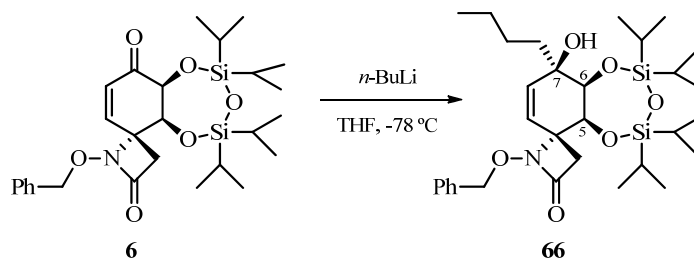
LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 973 (2M+Na)⁺, 498 (M+Na)⁺, 476 (M+H)⁺.

LRMS (*EI*): *m/z* 475 (M⁺, 3), 460 (11), 434 (1), 418 (100), 327 (2), 312 (5), 296 (1), 282 (3), 194 (10), 91 (51), 73 (35).

A.E. (C₂₄H₃₇NO₅Si₂): Hallado: C, 60.82; H, 7.97; N, 3.24.

Calculado: C, 60.59; H, 7.84; N, 2.94.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-butil-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (66)



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**6**) (486 mg, 0.914 mmol) en THF (10 ml), se adicionó a -78 °C *n*-BuLi (1.6 M en hexano, 0.63 ml, 1.005 mmol) y la mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 14 horas. Pasado este tiempo, se añadió a -78 °C una disolución tampón Na₂HPO₄ (0.1 M, 5 ml) y la mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó realizando dos columnas cromatográficas, primero (hexano/AcOEt, 7:1) y después (hexano/CH₂Cl₂, 1:15), obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-butil-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**66**) (334 mg, rto. 62%), como un aceite incoloro, y la cetona de partida **6** (53 mg, 11%).

R_f = 0.56 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.20 (TLC, hexano/CH₂Cl₂, 1:15, eluída 3 veces).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.34 (5H, s, Ph), 5.51 (1H, *parte A sist. AB*, J = 10.2 Hz, H-8), 5.32 (1H, *parte B sist. AB*, J = 10.2 Hz, H-9), 4.95 (2H, OCH₂Ph), 4.32 (1H, s, H-5), 4.26 (1H, s, H-6), 3.17 (1H, *parte A sist. AB*, J = 13.5 Hz, H-3), 2.87 (1H, s, OH), 2.31 (1H, *parte B sist. AB*, J = 13.5 Hz, H-3'), 1.51-1.20 (6H, m, (CH₂)₃CH₃), 1.20-0.80 (31H, m, (CH₂)₃CH₃ y TIPDS).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 165.3, 135.9, 135.2 (C-8), 128.9, 128.7, 128.5, 126.3 (C-9), 78.9, 76.8 (C-6), 72.4 (C-7), 70.0 (C-5), 66.1 (C-4), 41.0 (C-3), 39.6, 25.4, 23.2, 17.7, 17.6, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 14.5, 14.0, 13.8, 13.4, 13.0.

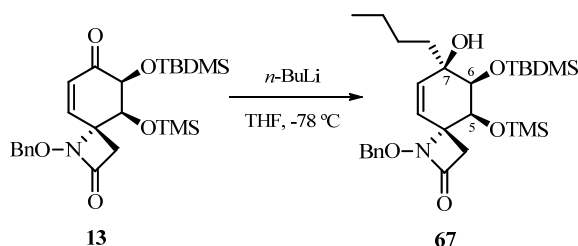
IR (film): ν 3560, 3032, 2946, 2868, 1782, 1465, 1386, 1249, 1213, 1161, 1134, 1107, 1052, 1001, 960, 930, 885, 802, 758, 696 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 1201 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 612 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 590 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 572 ($\text{M}-17$) $^+$.

A.E. ($\text{C}_{31}\text{H}_{51}\text{NO}_6\text{Si}_2$): Hallado: C, 63.26; H, 8.89; N, 2.85.

Calculado: C, 63.12; H, 8.71; N, 3.07.

Síntesis de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S ,7 R)-1-(benciloxi)-7-butil-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (67)



A una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (140 mg, 0.295 mmol) en THF (1.5 ml) se adicionó a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ *n*-BuLi (1.6 M en hexano, 0.2 ml, 0.353 mmol). Después de 1.5 horas a $-78\text{ }^\circ\text{C}$, se adicionó más *n*-BuLi (1.6 M en hexano, 0.2 ml, 0.295 mmol) y se agitó a esta temperatura durante otra hora. Pasado este tiempo, se añadió a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ una disolución tampón Na_2HPO_4 (0.1 M, 1.5 ml) y a temperatura ambiente AcOEt (2 ml). Se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 10:1) obteniéndose *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S ,7 R)-1-(benciloxi)-7-butil-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-

[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**67**) (51 mg, rto.32%), como un aceite incoloro, y la cetona de partida **13** (47 mg, 34%).

$R_f = 0.56$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3): δ 7.34 (5H, s, Ph), 5.40 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, H-8), 5.21 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, H-9), 5.01 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.4$ Hz, OCH_2Ph), 4.82 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.4$ Hz, OCH_2Ph), 4.14 (1H, s, H-5), 3.79 (1H, s, H-6), 3.23 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.0$ Hz, H-3), 2.62 (1H, s, OH), 2.26 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.0$ Hz, H-3'), 1.57-1.24 (6H, m, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 0.96 (3H, t, $J = 6.6$ Hz, $(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$), 0.85 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.17 (9H, s, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), 0.16 (3H, s, SiCH_3), 0.11 (3H, s, SiCH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 165.3, 135.6, 135.3 (C-8), 128.9, 128.4, 128.2, 127.4 (C-9), 78.9, 76.8 (C-6), 73.6 (C-7), 67.2 (C-5), 66.4 (C-4), 40.6 (C-3), 38.8, 25.9, 25.4, 23.2, 18.2, 13.9, 0.4, 0.3, -3.2.

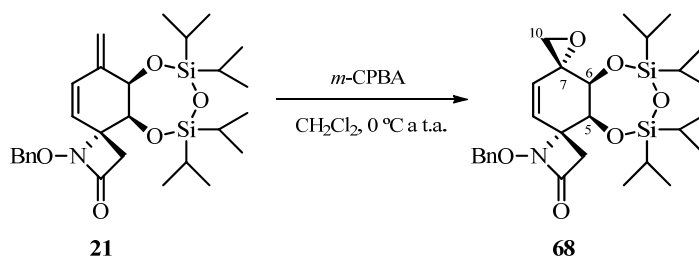
IR (film): ν 3571, 3028, 2955, 2927, 2859, 1782, 1463, 1391, 1252, 1132, 1100, 1053, 971, 917, 880, 837, 779, 696 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 1089 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 606 ($\text{M}+73$) $^+$, 556 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 534 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 516 ($\text{M}-17$) $^+$.

A.E. ($\text{C}_{28}\text{H}_{47}\text{NO}_5\text{Si}_2$): Hallado: C, 63.19; H, 8.99; N, 2.85.

Calculado: C, 63.00; H, 8.87; N, 2.62.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-(benciloxi)-7,10-epoxi-5,6-dihidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (68)



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**21**) (200 mg, 0.378 mmol) en CH₂Cl₂ (6 ml) se adicionó a 0 °C ácido 3-cloroperbenzoico (172 mg, 57-80% en peso, 0.567 mmol). Después de 30 min a 0 °C, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ (3 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ sat. (3 x 3 ml) y NaCl sat. (3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-(benciloxi)-7,10-epoxi-5,6-dihidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**68**) (150 mg, rto. 73%) como un aceite incoloro.

$R_f = 0.52$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.42-7.30 (5H, m, Ph), 5.75 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-9), 5.23 (1H, dd, $J = 9.9, 1.0$ Hz, H-8), 5.01 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH₂Ph), 4.96 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH₂Ph), 4.58 (1H, d, $J = 2.9$ Hz, H-5), 4.02 (1H, dd, $J = 2.9, 1.0$ Hz, H-6), 3.23 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.8$ Hz, H-3), 3.03 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 4.6$ Hz, H-10), 2.91 (1H, *parte B sist. AB*,

$J = 4.6$ Hz, H-10'), 2.42 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.8$ Hz, H-3'), 1.12-0.91 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 164.8, 135.3 (C-9), 134.8, 129.0, 128.8, 128.6 (C-8), 128.5, 78.8, 75.5 (C-6), 70.9 (C-5), 65.4 (C-4), 57.5 (C-7), 53.3 (C-10), 40.7 (C-3), 17.6, 17.55, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 14.3, 13.4, 13.3, 13.1.

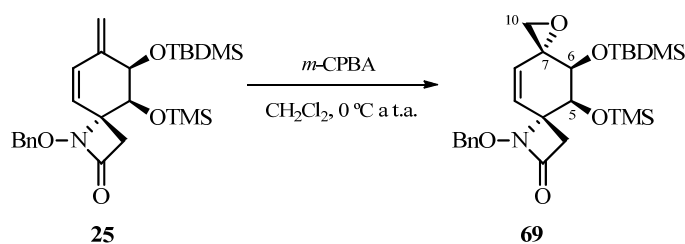
IR (film): ν 3011, 2947, 2892, 2869, 1777, 1465, 1378, 1369, 1251, 1216, 1153, 1128, 1112, 1094, 1068, 1007, 919, 885, 846, 783, 758, 696 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 1113 ($2\text{M}+\text{Na}^+$), 568 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 546 ($\text{M}+\text{H}^+$).

A.E. ($\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_6\text{Si}_2$): Hallado: C, 61.76; H, 8.15; N, 2.83.

Calculado: C, 61.61; H, 7.94; N, 2.57.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7,10-epoxi-7-metil-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (69)



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-metiliden-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**25**) (200 mg, 0.422 mmol) en CH_2Cl_2 (6 ml) se adicionó a 0 °C ácido *m*-CPBA (109 mg, 57-80% en peso, 0.633 mmol).³² Después de 30 min a 0 °C, la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se diluyó

³² Como ejemplos de epoxidación regioselectiva del doble enlace exocíclico de un 3-metilenciclohexeno con *m*CPBA, ver: (a) White, J.D.; Shin, H.; Kim, T-S.; Cutshall, N.S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2404-2419. (b) Park, T.K.; Danishefsky, S.J. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2667-2670.

con CH₂Cl₂ (3 ml) y se lavó sucesivamente con NaHCO₃ sat. (3 x 3 ml) y NaCl sat. (3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7,10-epoxi-7-metil-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**69**) (175 mg, rto. 85%) como un aceite incoloro.

R_f = 0.50 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (200 MHz, CO(CD₃)₂):³³ δ 7.50-7.29 (5H, m, Ph), 5.97 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.8 Hz, H-9), 5.39 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.8 Hz, H-8), 5.02 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 4.93 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 4.34 (1H, s ancho, H-6), 3.56 (1H, s ancho, H-5), 3.17 (1H, m, H-3), 2.97 (2H, s ancho, H-10 y H-10'), 2.44 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, H-3'), 0.87 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.16 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.14 (3H, s, SiCH₃), 0.09 (3H, s, SiCH₃).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃):³³ δ 7.43-7.24 (5H, m, Ph), 5.63 (1H, d, *J* = 9.7 Hz, H-9), 5.20 (1H, m, H-8), 4.99 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 4.88 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 4.29 (1H, s ancho, H-5 o H-6), 3.43 (1H, s ancho, H-6 o H-5), 3.36 (1H, m, H-3), 2.87 (2H, s ancho, H-10 y H-10'), 2.34 (1H, d, *J* = 14.1 Hz, H-3'), 0.82 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.15 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.07 (3H, s, SiCH₃), 0.01 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CO(CD₃)₂): δ 165.0, 133.7 (C-9), 131.3, 129.8, 129.5, 129.3, 128.9 (C-8), 79.6, 75.6 (C-5 o C-6), 66.5 (C-6 o C-5), 64.7, 55.9, 52.9 (C-10), 41.8 (C-3), 26.2, 18.8, 0.6, -3.8, -4.7.

IR (film): ν 3028, 2957, 2927, 2891, 2857, 1781, 1472, 1407, 1362, 1255, 1151, 1100, 1055, 994, 928, 881, 842, 803, 778, 753, 696 cm⁻¹.

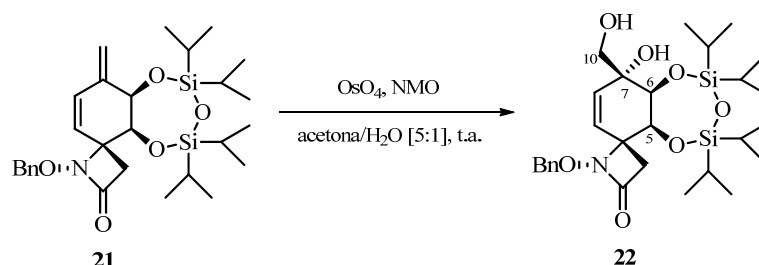
³³ En el espectro de ¹H-RMN (tanto en CO(CD₃)₂, como en CDCl₃), todas las señales, excepto las asignadas a los grupos protectores, aparecen muy anchas y no presentan una mayor resolución al variar la temperatura.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1001 (2M+Na)⁺, 562 (M+73)⁺, 512 (M+Na)⁺, 490 (M+H)⁺.

A.E. (C₂₅H₃₉NO₅Si₂): Hallado: C, 61.43; H, 8.19; N, 3.09.

Calculado: C, 61.31; H, 8.03; N, 2.86.

1.2.1.2. Síntesis de los dioles **22**³⁴ y **29**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**21**) (377 mg, 0.712 mmol) en acetona (6 ml) se adicionó, secuencialmente y a temperatura ambiente, agua (1.2 ml), *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (189 mg, 1.566 mmol) y tetróxido de osmio (2.5% en peso en *t*-BuOH, 0.54 ml, 0.043 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Pasado este tiempo, se añadió una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ (10%, 0.5 ml), se agitó 15 min y a continuación, la mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 2:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**22**) (352 mg, rto. 88%) como un sólido ligeramente amarillo.

P.f.: 155-156 °C.

³⁴ Los datos de difracción de rayos X del compuesto **22** están recogidos en el Anexo A.

$R_f = 0.54$ (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.13 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3):³⁵ δ 7.44-7.30 (5H, m, Ph), 5.63 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-9), 5.56 (1H, dd, $J = 10.1, 1.1$ Hz, H-8), 5.00 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH_2Ph), 4.93 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH_2Ph), 4.57 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H-5), 4.31 (1H, dd, $J = 2.6, 1.1$ Hz, H-6), 3.68 (1H, dd, $J = 11.1, 5.8$ Hz, H-10), 3.56 (1H, dd, $J = 11.1, 5.8$ Hz, H-10'), 3.19 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3), 2.34 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3'), 2.11 (1H, t, $J = 5.8$ Hz, HO-C(10)), 1.80 (1H, s, HO-C(7)), 1.15-0.96 (28H, m, TIPDS).

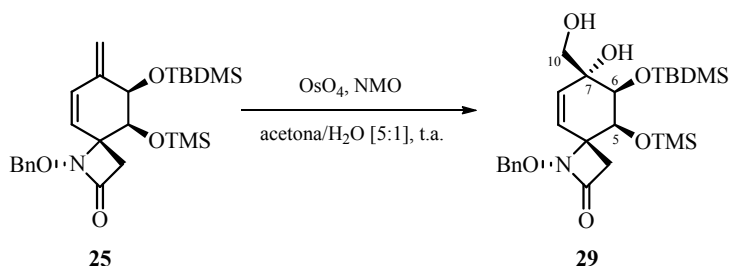
$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 165.2 (C-2), 135.9, 132.3 (C-9), 129.2 (C-8), 129.2, 128.8, 128.5, 78.8, 75.8 (C-6), 72.9 (C-7), 68.8 (C-5), 66.4 (C-10), 66.1 (C-4), 40.4 (C-3), 17.6, 17.5, 17.2, 17.15, 17.1, 17.05, 17.0, 14.5, 14.0, 13.3, 13.2.

IR (KBr): ν 3428, 2946, 2868, 1761, 1633, 1464, 1394, 1367, 1250, 1217, 1145, 1089, 1063, 1003, 928, 885, 696 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1149 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, 586 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 564 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

A.E. ($\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NO}_7\text{Si}_2$): Hallado: C, 59.36; H, 7.74; N, 2.60.

Calculado: C, 59.65; H, 8.04; N, 2.48.



³⁵ En algunas ocasiones, dependiendo de la concentración de la muestra y de la cantidad de agua que contenga el CDCl_3 empleado como disolvente, se observa una variación en la multiplicidad de las señales de $^1\text{H-RMN}$ que aparecen a δ 3.68 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.1$ Hz, H-10), 3.56 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.1$ Hz, H-10'), 2.11 (1H, s ancho, HO-C(10)) y 1.80 (1H, s, HO-C(7)); pudiendo ser sustituidas las dos últimas por una única señal a δ 2.19 (2H, s ancho, 2 x OH).

A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-6[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-metiliden-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**25**) (250 mg, 0.528 mmol) en acetona (4.5 ml) se adicionó, secuencialmente y a temperatura ambiente, agua (0.9 ml), *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (140 mg, 1.162 mmol) y tetróxido de osmio (2.5% en peso en *t*-BuOH, 0.4 ml, 0.032 mmol).³⁶ La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Pasado este tiempo, se añadió una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ (10%, 0.5 ml), se agitó 15 min y a continuación, la mezcla se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida, obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-6[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-7-(hidroximetil)-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**29**) (268 mg, rto. cuant.)³⁷ como un sólido blanco.

P.f.: 123-124 °C.

R_f = 0.55 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.13 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):³⁸ δ 7.42-7.32 (5H, m, Ph), 5.47 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, H-9), 5.41* (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, H-8), 5.01 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.84 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.48* (1H, s ancho, H-5), 3.83* (1H, s ancho, H-6), 3.67* (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, H-10), 3.45 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.1 Hz, H-10'), 3.24* (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.4 Hz, H-3), 2.26* (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.4 Hz, H-3'), 2.04* (2H, s ancho, 2 x OH), 0.81 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.19 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.13 (3H, s, SiCH₃), 0.08 (3H, s, SiCH₃).

³⁶ Como ejemplo de dihidroxilación regioselectiva del doble enlace exocíclico de un 3-metilenciclohexeno, ver: Ogawa, S.; Sato, K.; Miyamoto, Y. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1993**, 691-696.

³⁷ Aunque el diol **29** se puede utilizar en la siguiente reacción sin purificar, normalmente, se filtra a través de gel de sílice empleando AcOEt como eluyente (rto. 99%).

³⁸ Las señales de ¹H-RMN marcadas con un asterisco* aparecen ensanchadas.

¹H-RMN (300 MHz, C₆D₆): δ 7.34-7.27 (2H, m, Ph), 7.20-7.03 (3H, m, Ph), 5.31 (2H, s ancho, H-8 y H-9), 4.82 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH₂Ph), 4.80 (1H, s ancho, H-5), 4.72 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.2$ Hz, OCH₂Ph), 3.97 (1H, s ancho, H-6), 3.63 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-10), 3.39 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-3), 3.28 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-10'), 2.19 (1H, d, $J = 13.0$ Hz, H-3'), 2.45 (1H, s ancho, OH), 1.30 (1H, s ancho, OH), 0.87 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.28 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.19 (3H, s, SiCH₃), 0.12 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 165.3, 135.9, 133.4 (C-9), 129.2, 128.8, 128.6 (C-8), 128.5, 78.8, 76.3 (C-6), 73.7 (C-7), 66.5 (C-4), 66.0 (C-5), 65.9 (C-10), 40.3 (C-3), 26.1, 18.2, 0.4, -2.8, -5.4.

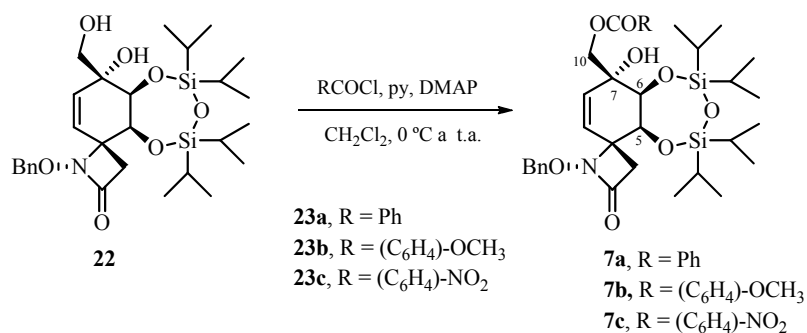
IR (film): ν 3434, 3028, 2956, 2927, 2891, 2858, 1755, 1478, 1462, 1411, 1389, 1362, 1253, 1212, 1141, 1090, 967, 939, 918, 882, 837, 756, 696 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1037 (2M+Na)⁺, 580 (M+73)⁺, 530 (M+Na)⁺, 508 (M+H)⁺.

A.E. (C₂₅H₄₁NO₆Si₂): Hallado: C, 59.26; H, 8.25; N, 2.98.

Calculado: C, 59.13; H, 8.14; N, 2.76.

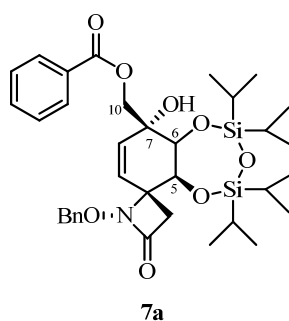
1.2.1.3. Protección selectiva de los hidroxilos primarios de los dioles **22** y **29**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]-non-8-en-2-ona (**22**) (1.770 mmol) en CH₂Cl₂ (40 ml) se adicionó,

secuencialmente y a 0 °C, piridina (4.950 mmol), 4-dimetilaminopiridina (0.035 mmol) y el cloruro de benzoilo **23a-c** (4.260 mmol) correspondiente en cada caso. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas.³⁹ Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo con Et₂O (x 3). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (10%) y NaCl sat., se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna obteniéndose el correspondiente alcohol protegido **7a-c**.

***rac*-(1R_N,4R,5S,6S,7R)-(1-Benciloxi)-7-[(benciloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-5,6-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7a**)**



Cuando se utilizó como producto de partida el cloruro de benzoilo (**23a**) (0.61 ml, 4.260 mmol) se obtuvo, tras purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) *rac*-(1R_N,4R,5S,6S,7R)-(1-benciloxi)-7-[(benciloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-5,6-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7a**) (1.160 g, rto. 98%) como un sólido blanco.

P.f.: 151-152 °C.

³⁹ En algunas ocasiones, para que la reacción se completara fue necesario añadir a 0 °C más piridina (1.4 equiv.), DMAP (0.01 equiv.) y cloruro de benzoilo (1.2 equiv.), y agitar la mezcla a temperatura ambiente durante otras 14 horas.

$R_f = 0.36$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.75 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.04 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, Bz), 7.60 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, Bz), 7.47 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, Bz), 7.43-7.29 (5H, m, Ph), 5.72 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.1$ Hz, H-8), 5.66 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.1$ Hz, H-9), 4.98 (2H, s, OCH_2Ph), 4.76 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-5), 4.46 (1H, s, H-6), 4.42 (2H, s, H-10 y H-10'), 3.22 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.9$ Hz, H-3), 2.35 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.9$ Hz, H-3'), 2.35 (1H, s, OH), 1.13 (7H, s ancho, TIPDS), 1.11-0.94 (21H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 166.6, 165.0, 135.8, 133.4, 132.6 (C-9), 129.5, 129.1, 128.8, 128.5, 128.0 (C-8), 78.8, 75.2 (C-6), 72.6 (C-7), 68.6 (C-5), 68.3 (C-10), 66.0 (C-4), 40.4 (C-3), 17.7, 17.5, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 14.4, 14.1, 13.5, 13.3.

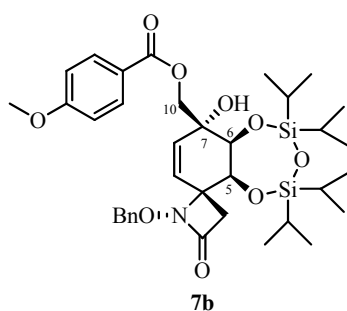
IR (KBr): ν 3410, 3065, 3029, 2946, 2891, 2868, 1747, 1721, 1631, 1465, 1383, 1278, 1155, 1122, 1097, 1069, 1006, 941, 885, 696 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES* $^+$): m/z 1357 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 690 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 668 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

A.E. ($\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{NO}_8\text{Si}_2$): Hallado: C, 62.85; H, 7.31; N, 2.25.

Calculado: C, 62.94; H, 7.39; N, 2.10.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(Benciloxi)-7-[[4-(metoxibenzoil)oxi]metil]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (7b)**



Cuando se utilizó como producto de partida el cloruro de 4-metoxibezoilo (**23b**) (0.12 ml, 0.868 mmol) se obtuvo, tras purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-{[(4-metoxibenzoil)oxi]metil}-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7b**) (221 mg, rto. 86%).

P.f.: 142-144 °C.

R_f= 0.23 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.83 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.99 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 8.9 Hz, *p*-MeO-Bz), 7.36 (5H, m, Ph), 6.94 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 8.9 Hz, *p*-MeO-Bz), 5.70 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-8), 5.67 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-9), 4.97 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.95 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.75 (1H, d, *J* = 2.3 Hz, H-5), 4.43 (1H, s.ancho, H-6), 4.38 (2H, *sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, H-10, H-10'), 3.88 (3H, s, OCH₃), 3.23 (1H, *parte a sist. AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3), 2.34 (1H, *parte B sist AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3'), 2.33 (1H, s, OH), 1.07-0.99 (28H, TIPDS).

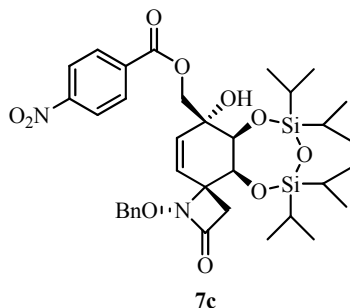
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃):δ 166.5 (C-2), 164.9, 163.7, 135.8, 132.5 (C-9), 131.6, 129.1, 128.8, 128.5 (C-8), 128.2, 113.8, 78.8, 75.3 (C-6), 72.0 (C-7), 68.7 (C-5), 68.1 (C-10), 66.0 (C-4), 55.5, 40.5 (C-3), 17.7, 17.6, 17.5, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9.

IR (KBr) ν 3419, 2946, 2252, 1757, 1716, 1607, 1582, 1512, 1465, 1421, 1372, 1257, 1168, 1096, 1007, 849, 733, 611 cm⁻¹.

LMRS (*API-ES*⁺): *m/z* 1419 (2M+Na)⁺, 721 (M+Na)⁺, 696 (M+H)⁺.

A.E. (C₃₆H₅₁NO₉Si₂) Hallado: C, 61.99; H, 7.31; N, 2.09;

Calculado: C, 61.95; H, 7.37; N, 2.01.



P.f.: 163-165 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.34 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 9.0 Hz, *p*-NO₂-Bz), 8.22 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 9.0 Hz, *p*-NO₂-Bz), 7.38 (5H, m, Ph), 5.68 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-9), 5.67 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, H-8), 4.98 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.97 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.67 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-5), 4.46 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, H-10), 4.44 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, H-10'), 4.43 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-6), 3.22 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3), 2.37 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3'), 1.84 (1H, s, OH), 1.14 (7H, s ancho, TIPDS), 1.06-0.99 (21H, m, TIPDS).

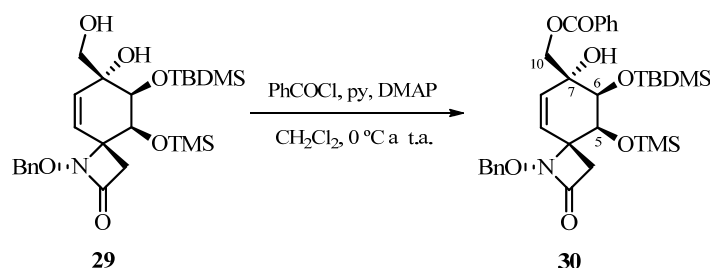
^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 165.3, 164.9, 150.9, 136.2, 135.2, 133.4 (C-9), 130.9, 129.4, 129.1, 128.8, 127.8 (C-8), 123.9, 79.1, 75.5 (C-6), 72.8 (C-7), 69.2 (C-10), 68.8 (C-5), 66.1 (C-4), 40.7 (C-3), 17.9, 17.8, 17.4, 17.3, 17.2.

IR (KBr) ν 3458, 2947, 2868, 1756, 1727, 1608, 1530, 1464, 1347, 1277, 1145, 1101, 1009, 935, 885, 721, 695 cm^{-1} .

LMRS (*API-ES*⁺): m/z 1449 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, 736 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 714 ($\text{M}+\text{H}$)

A.E. ($\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{NO}_9\text{Si}_2$) Hallado: C, 59.00; H, 6.75; N, 3.89;

Calculado: C, 58.96; H, 6.79; N, 3.93.



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butil-dimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-7-(hidroximetil)-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**29**) (165 mg, 0.325 mmol) en CH_2Cl_2 (3 ml) se adicionó, secuencialmente y a 0 °C, piridina (37 μl , 0.455 mmol), una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (0.004 mmol) y cloruro de benzoilo (46 μl , 0.390 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas.⁴⁰ Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO_3 sat. y la mezcla se extrajo con Et_2O (3 x 3 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con (HCl 10%, 3 ml) y NaCl sat. (3 ml), se secó con MgSO_4 anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna

⁴⁰ En algunas ocasiones, para que la reacción se completara fue necesario añadir a 0 °C más piridina (1.4 mmol), DMAP (0.01 mmol) y cloruro de benzoilo (1.2 mmol), y agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante otras 12 horas.

(hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**30**) (185 mg, rto. 93%) como un sólido blanco de aspecto espumoso y bajo punto de fusión.

P.f.: 38-39 °C.

R_f = 0.36 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.75 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.06 (2H, dm, *J* = 7.8 Hz, Bz), 7.60 (1H, tm, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.47 (2H, ddm, *J* = 7.8, 7.4 Hz, Bz), 7.41-7.30 (5H, m, Ph), 5.55 (2H, s, H-8 y H-9), 5.05 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.86 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.63 (1H, s, H-5), 4.43 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, H-10), 4.34 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, H-10'), 3.99 (1H, s, H-6), 3.27 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.4 Hz, H-3), 2.32 (1H, s ancho, OH), 2.29 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.4 Hz, H-3'), 0.82 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.20 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.16 (3H, s, SiCH₃), 0.07 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.9, 165.1, 135.6, 133.5 (C-9), 133.4, 129.6, 129.5, 129.1, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3 (C-8), 78.7, 76.5 (C-6), 73.1 (C-7), 68.2 (C-10), 66.3 (C-5), 66.1 (C-4), 40.2 (C-3), 26.0, 18.1, 0.4, -2.7, -5.4.

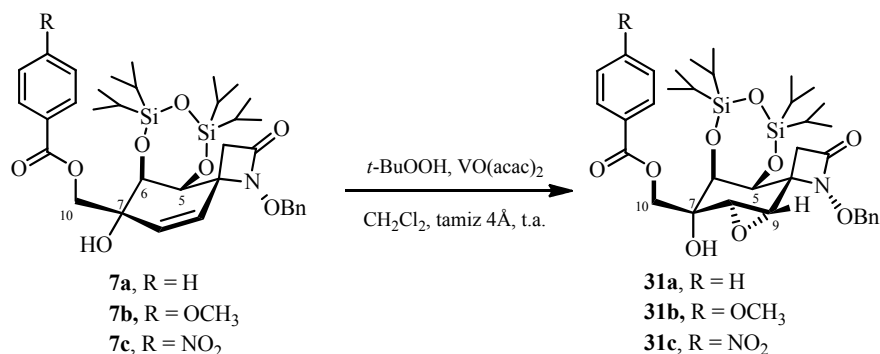
IR (film): ν 3420, 3065, 3038, 2956, 2927, 2891, 2855, 1756, 1723, 1602, 1584, 1452, 1411, 1367, 1274, 1255, 1144, 1095, 938, 918, 881, 836, 777, 755, 712 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1245 (2M+Na)⁺, 684 (M+73)⁺, 634 (M+Na)⁺, 612 (M+H)⁺.

A.E. (C₃₂H₄₅NO₇Si₂): Hallado: C, 62.93; H, 7.58; N, 2.54.

Calculado: C, 62.81; H, 7.41; N, 2.29.

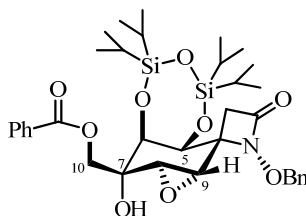
1.2.1.4. Epoxidación diastereoselectiva del doble enlace de las ciclohexeno Espiro- β -lactamas **7a-c** y **30**



A una disolución del correspondiente alcohol terciario protegido **7a-c** (0.069 mmol) en CH₂Cl₂ se adicionó a temperatura ambiente hidróperóxido de *tert*-butilo (80% en peso en (t-BuO)₂/H₂O [3:2], 0.689 mmol) y tamiz molecular de 4 Å de diámetro de poro. Después de 10 min, se añadió VO(acac)₂ (0.021 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. Pasado este tiempo, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se filtró a vacío a través de *Celita* para eliminar el tamiz. La disolución se lavó con una disolución acuosa de NaHCO₃ (10%), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna obteniéndose los epóxidos correspondientes **31a-c**.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (31a)**

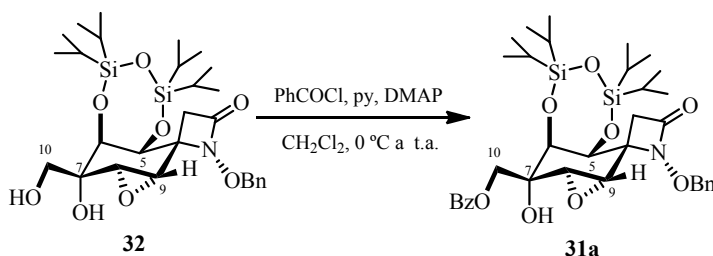
Método A



31a

Cuando se utilizó como producto de partida *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benciloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7a**) (46 mg, 0.069 mmol) se obtuvo, tras purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1), *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benciloxi)metil]-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**31a**) (41 mg, rto.87%) como un sólido blanco.

Método B



32

31a

A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**32**) (7 mg, 0.012 mmol) en CH₂Cl₂ (0.15 ml) se

adicionó, secuencialmente y a 0 °C, piridina (2 µl, 0.024 mmol), una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (0.001 mmol) y cloruro de benzoilo (2 µl, 0.014 mmol). Después de 18 horas a temperatura ambiente, se añadió a 0 °C más piridina (0.024 mmol), DMAP (0.001 mmol) y cloruro de benzoilo (0.017 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante otras 18 horas. Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo con Et₂O (3 x 2 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con (HCl 10%, 2 ml) y NaCl sat. (2 ml), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 6:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**31a**) (5 mg, rto. 62%) como un sólido blanco.

P.f.: 136-137 °C.

R_f = 0.36 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.51 (TLC, hexano/AcOEt, 2:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8.07 (2H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.60 (1H, tm, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.53-7.41 (4H, m, Bz y Ph), 7.41-7.31 (3H, m, Ph), 5.12 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.0 Hz, OCH₂Ph), 5.03 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.0 Hz, OCH₂Ph), 4.58 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10), 4.53 (1H, s ancho, H-5), 4.52 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10'), 4.24 (1H, s ancho, H-6), 3.52 (2H, s ancho, H-8 y H-9), 3.16 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3), 2.81 (1H, s, OH), 2.48 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3'), 1.13-0.98 (28H, m, TIPDS).

¹H-RMN (300 MHz, C₆D₆): δ 8.16 (2H, dm, *J* = 8.3 Hz, Bz), 7.50 (1H, d ancho, *J* = 7.6 Hz, Bz), 7.20-7.01 (6H, m, Bz y Ph), 5.10 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 5.06 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.76 (1H, t, *J* = 1.9 Hz, H-5 o H-6), 4.52 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-10), 4.45 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-10'), 4.28 (1H, m, H-6 o H-5), 3.17 (1H, d, *J* = 13.7 Hz,

H-3), 3.02 (1H, m, H-8 o H-9), 2.96 (1H, dd, $J = 3.7, 1.9$ Hz, H-9 o H-8), 2.73 (1H, m, OH), 2.18 (1H, dd, $J = 13.7, 1.9$ Hz, H-3'), 1.35-0.80 (28H, m, TIPDS).

¹H-RMN (500 MHz, CO(CD₃)₂): δ 8.12 (2H, m, Bz), 7.66 (1H, m, Bz), 7.57-7.46 (4H, m, Bz y Ph), 7.42-7.32 (3H, m, Ph), 5.12 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.9$ Hz, OCH₂Ph), 5.06 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.9$ Hz, OCH₂Ph), 4.98 (1H, s, OH), 4.88 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-5), 4.59 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, H-10), 4.54 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, H-10'), 4.37 (1H, dd, $J = 2.4, 1.3$ Hz, H-6), 3.71 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-9), 3.64 (1H, dd, $J = 3.7, 1.3$ Hz, H-8), 3.08 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3), 2.68 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3'), 1.23-0.92 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.4, 163.9, 135.2, 133.4, 129.6, 129.5, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 78.8, 76.6 (C-6), 71.4 (C-7), 66.8 (C-10), 66.2 (C-5), 65.5 (C-4), 60.3 (C-9), 55.0 (C-8), 38.3 (C-3), 17.6, 17.5, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 14.3, 14.2, 13.5, 13.2.

¹³C-RMN (125 MHz, CO(CD₃)₂): δ 166.9, 164.4, 136.9, 134.2, 131.2, 130.5, 129.8, 129.5, 129.4, 129.3, 79.2, 78.5 (C-6), 72.3 (C-7), 68.7 (C-10), 67.8 (C-5), 66.6 (C-4), 59.8 (C-9), 56.2 (C-8), 38.8 (C-3), 18.2, 18.1, 17.7, 17.6, 17.55, 17.5, 15.4, 15.2, 14.4, 14.0.

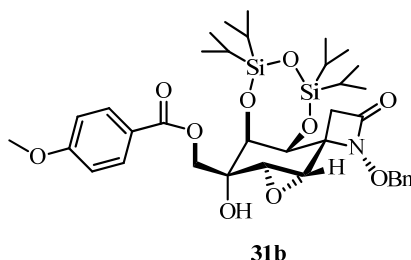
IR (film): ν 3430, 2947, 2900, 2868, 1767, 1725, 1599, 1589, 1465, 1451, 1394, 1370, 1273, 1148, 1104, 1075, 1007, 941, 886, 823, 756, 711 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1389 (2M+Na)⁺, 706 (M+Na)⁺, 684 (M+H)⁺.

A.E. (C₃₅H₄₉NO₉Si₂): Hallado: C, 61.35; H, 7.38; N, 2.29.

Calculado: C, 61.46; H, 7.22; N, 2.05.

***rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(Benciloxi)-7-[[4-metoxibenzoil]oxi]metil}-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (31b)**



Cuando se utilizó como producto de partida *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-[[4-metoxibenzoil]oxi]metil}-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7b**) (155 mg, 0.222 mmol) se obtuvo, tras purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1), *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[[4-metoxibenzoil]oxi]metil}-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**31b**) (106 mg, rto. 67%) como un sólido blanco.

P.f.: 140-142 °C.

R_f = 0.40 (TLC, hexano/AcOEt, 2:1); 0.83 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (2H, *sistema AA'BB'*, *J* = 8.9 Hz, p-MeO-Bz), 7.45 (2H, m, Ph), 7.36 (3H, m, Ph), 6.92 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 8.9 Hz, p-MeO-Bz), 5.10 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 5.02 (1H, *Parte B sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 4.53 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.4 Hz, H-10), 4.51 (1H, s, H-5), 4.48 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.4 Hz, H-10'), 4.21 (1H, dd, *J* = 2.0, 1.2 Hz, H-6), 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.50 (1H, dd, *J* = 3.8 Hz, 1.2 Hz, H-8), 3.49 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-9), 3.14 (1H, , *parte A sist. AB*, *J* = 13.9, H-3), 2.72

(1H, s, OH) ,2.46 (1H, , *parte B sist. AB*, $J = 13.9$, H-3'), 1.13-0.98 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 166.4, 164.1, 153.7, 135.5, 132.0, 129.2, 128.9, 128.7, 128.5, 122.1, 114.0, 79.0, 76.9 (C-6), 71.7 (C-7), 66.7 (C-10), 66.4 (C-5), 65.8 (C-4), 60.5 (C-9), 55.7, 55.3 (C-8), 38.5 (C-3), 17.6, 17.5, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 14.3, 14.2, 13.5, 13.2.

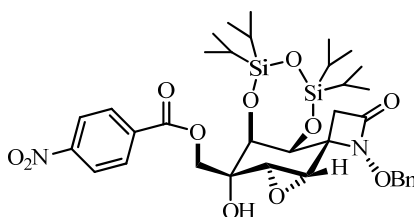
IR (film): ν 3390, 2946, 2868, 1768, 1742, 1708, 1607, 1512, 1465, 1258, 1169, 1104, 1010, 941, 769, 697 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1450 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, 737 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 715 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

A.E. ($\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{NO}_{10}\text{Si}_2$) Hallado: C, 60.35; H, 7.28; N, 1.99.

Calculado: C, 60.56; H, 7.20; N, 1.96.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(Benciloxi)-7-[[4-nitrobenzoil]oxi]metil}-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (31c)**



31c

Cuando se utilizó como producto de partida *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-(benciloxi)-7-[[4-nitrobenzoil]oxi]metil}-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**7c**) (122 mg, 0.069 mmol) se obtuvo, tras purificación por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1), *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[[4-nitrobenzoil]oxi]metil}-8,9-

epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisilo-xano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**31c**) (64 mg, rto. 52%) como un sólido blanco.

P.f.: 168-170 °C.

R_f = 0.55 (TLC, hexano/AcOEt, 2:1); 0.75 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (2H, *sistema AA'BB'*, *J* = 9.0 Hz, *p*-MeO-Bz), 8.24 (2H, *sist. AA'BB'*, *J* = 9 Hz, *p*-NO₂-Bz), 7.45 (2H, m, Ph), 7.36 (3H, m, Ph), 5.11 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 5.02 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.2 Hz, OCH₂Ph), 4.61 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.8 Hz, H-10), 4.58 (*parte B sist. AB*, *J* = 11.8 Hz, H-10'), 4.51 (1H, d, *J*_{5,6} = 2.1 Hz, H-5), 4.23 (1H, t, *J* = 1.3 Hz, H-6), 3.54 (1h, d, *J*_{9,8} = 3.7 Hz, H-9), 3.52 (1H, dd, *J*_{8,9} = 3.7 Hz, *J*_{8,6} = 1.1 Hz, H-8), 3.15 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3), 2.49 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3'), 1.10-1.01 (28H, m, TIPDS).

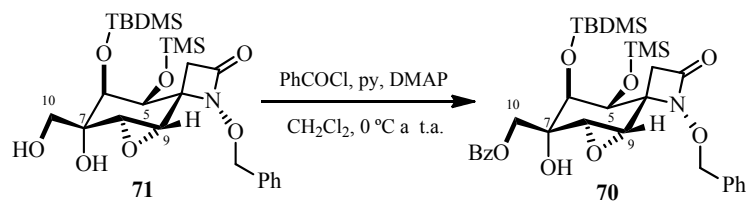
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.5, 163.8, 150.7, 135.1, 134.8, 130.7, 128.9, 128.7, 128.4, 123.6, 78.8, 76.6 (C-6), 71.2 (C-7), , 67.4 (C-10), 66.1 (C-5), 65.4 (C-4), 60.4 (C-9), 54.9 (C-8), 38.2 (C-3), 17.6, 17.5, 17.2, 17.0, 16.9, 16.8.

IR (film): ν 3418, 3113, 3034, 2948, 2894, 2253, 1766, 1731, 1607, 1530, 1465, 1348, 1274, 1104, 1009, 909, 734, 648 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1481(2M+Na)⁺, 751 (M+Na)⁺, 730 (M+H)⁺.

A.E. (C₃₅H₄₈N₂O₁₁Si₂) Hallado: C, 56.22; H, 6.97; N, 3.93.

Calculado: C, 58.96; H, 6.75; N, 3.67.

Método B

A una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S ,7 S ,8 S ,9 S)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-7-(hidroximetil)-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**71**) (32 mg, 0.061 mmol) en CH₂Cl₂ (0.8 ml) se adicionó, secuencialmente y a 0 °C, piridina (7 μ l, 0.085 mmol), una cantidad catalítica de 4-dimetilaminopiridina (0.001 mmol) y cloruro de benzoilo (9 μ l, 0.073 mmol). Después de 2 horas a temperatura ambiente, se añadió a 0 °C más piridina (0.085 mmol), DMAP (0.001 mmol) y cloruro de benzoilo (0.073 mmol), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante otras 16 horas. Pasado este tiempo, se neutralizó el medio añadiendo NaHCO₃ sat. y la mezcla se extrajo con Et₂O (3 x 2 ml). La fase orgánica se lavó sucesivamente con HCl (10%, 2 ml) y NaCl sat. (2 ml), se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 6:1) obteniéndose *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S ,7 S ,8 S ,9 S)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**70**) (27 mg, rto. 71%) como un sólido blanco.

P.f.: 113-114 °C.

***R*_f** = 0.35 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1); 0.73 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.08 (2H, dm, J = 7.1 Hz, Bz), 7.60 (1H, tm, J = 7.4 Hz, Bz), 7.52-7.42 (4H, m, Bz y Ph), 7.41-7.30 (3H, m, Ph), 5.10 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 5.07 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.1 Hz, OCH₂Ph),

4.63 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.6$ Hz, H-10), 4.45 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.6$ Hz, H-10'), 4.40 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-5), 3.80 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-6), 3.49 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-9), 3.45 (1H, dd, $J = 3.7, 1.5$ Hz, H-8), 3.23 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3), 2.78 (1H, s ancho, OH), 2.44 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.7$ Hz, H-3'), 0.89 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.17 (3H, s, SiCH₃), 0.14 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.12 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.5, 164.2, 134.9, 133.4, 129.7, 129.1, 128.7, 128.5, 128.4, 78.9, 77.9 (C-6), 71.4 (C-7), 67.1 (C-10), 66.0 (C-4), 63.8 (C-5), 60.6 (C-9), 56.1 (C-8), 38.7 (C-3), 26.1, 18.1, 0.2, -2.7, -5.3.

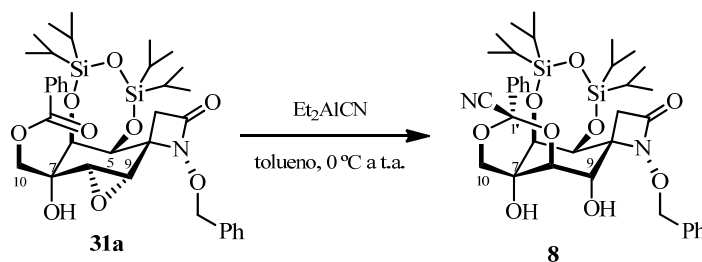
IR (film): ν 3433, 3028, 2956, 2927, 2891, 2858, 1766, 1724, 1602, 1586, 1452, 1411, 1375, 1363, 1272, 1255, 1107, 1027, 942, 910, 879, 835, 778, 756, 713 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1277 (2M+Na)⁺, 700 (M+73)⁺, 650 (M+Na)⁺, 628 (M+H)⁺.

A.E. (C₃₂H₄₅NO₈Si₂): Hallado: C, 61.29; H, 7.35; N, 2.40.

Calculado: C, 61.21; H, 7.22; N, 2.23.

1.2.1.5. Apertura del epoxialcohol 31a. Síntesis del cianobenciliden acetal 8



A una disolución de *rac*-(1R_N,4R,5S,6S,7S,8S,9S)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8,9-epoxi-5,6,7-trihidroxi-5,6-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**31a**) (689 mg, 1.007 mmol) en tolueno (14 ml) se adicionó a 0 °C cianuro de dietilaluminio (1.0 M en tolueno, 1.5 ml, 1.510 mmol). Después de 24 horas a temperatura ambiente, se añadió una mezcla de una

disolución acuosa saturada de tartrato sódico potásico y AcOEt ([1:1], 7 ml), y se agitó durante 5 min. A continuación, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 7 ml).⁴¹ La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en Et₂O y se sonicó durante 15 minutos. Se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (658 mg, rto. 92%),⁴² como un sólido blanco.

P.f.: 158-159 °C.

R_f = 0.49 (TLC, hexano/AcOEt, 2:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56-7.50 (2H, m, Ph), 7.47-7.30 (8H, m, Ph), 5.18 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.4 Hz, OCH₂Ph), 5.08 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.4 Hz, OCH₂Ph), 5.01 (1H, d, *J* = 3.6 Hz, H-5), 4.52 (1H, dd, *J* = 3.6, 1.4 Hz, H-6), 4.40 (1H, dd, *J* = 2.8, 1.4 Hz, H-8), 4.32 (1H, t, *J* = 3.2 Hz, H-9), 4.21 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.1 Hz, H-10), 4.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.1 Hz, H-10'), 3.95 (1H, s, HO-C(7)), 3.62 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, HO-C(9)), 3.10 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.2 Hz, H-3), 2.33 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.2 Hz, H-3'), 1.14-0.95 (22H, m, TIPDS), 0.83-0.75 (3H, m, TIPDS), 0.63-0.56 (3H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.7, 135.6, 134.4, 130.3, 129.4, 129.2, 128.9, 128.3, 125.6, 114.5 (CN), 95.2 (C-1'), 79.2, 78.1 (C-6), 76.7 (C-9), 76.4 (C-8), 70.7 (C-10), 67.7 (C-4), 65.8 (C-5), 65.6 (C-7), 37.3 (C-3), 17.8, 17.6, 17.5, 17.2, 17.1, 16.8, 16.7, 16.6, 14.2, 13.1, 13.0.

⁴¹ La utilización de una disolución acuosa de tartrato sódico potásico al 10%, en lugar de una saturada, suele disminuir la formación de emulsiones durante la extracción.

⁴² Aunque en la reacción se aísla como único producto (tanto por TLC, como por ¹H-RMN) el acetal **8** con un rendimiento del 92% (658 mg), su purificación por cromatografía en columna (SiO₂) lo hidroliza parcialmente a los correspondientes benzoatos **33**, **34** (rto. 8%), disminuyendo el rendimiento al 66%. Para minimizar su hidrólisis, el acetal **8** puede ser utilizado en la siguiente reacción sin purificar.

IR (KBr): ν 3451, 2946, 2889, 2862, 2218, 1748, 1631, 1462, 1389, 1278, 1248, 1154, 1099, 1055, 922, 883, 855, 804, 744, 695 cm^{-1} .

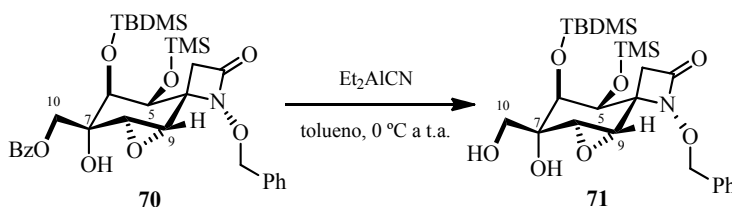
LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1444 ($2M+Na$)⁺, 733 ($M+Na$)⁺, 711 ($M+H$)⁺, 684 ($M-26$)⁺.

LRMS (*EI*): m/z 710 (M^+ , 0.2), 683 (0.5), 588 (1), 561 (1), 532 (1), 518 (1), 439 (1), 399 (2), 365 (2), 339 (7), 289 (5), 261 (6), 191 (4), 163 (4), 147 (6), 135 (11), 119 (8), 105 (98), 91 (100), 77 (19).

A.E. ($C_{36}H_{50}N_2O_9Si_2$): Hallado: C, 60.75; H, 7.18; N, 3.89.

Calculado: C, 60.82; H, 7.09; N, 3.94.

Intento de apertura del epóxido 70: Reacción de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butil-dimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-aza-espiro[3.5] nonan-2-ona (70) y Et₂AlCN



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-aza-espiro[3.5]nonan-2-ona (**70**) (184 mg, 0.293 mmol) en tolueno (2 ml) se adicionó a 0 °C cianuro de dietilaluminio (1.0 M en tolueno, 0.32 ml, 0.322 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 días, añadiendo más Et₂AlCN (0.293 mmol) a las 24 horas de reacción. Pasados los dos días, se añadió una mezcla de una disolución acuosa saturada de tartrato sódico potásico y AcOEt ([1:1], 5 ml), y se agitó durante 5 min. A continuación, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt,

3:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-8,9-epoxi-7-hidroxi-7-(hidroximetil)-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (**71**) (97 mg, rto. 63%), como un sólido blanco.

P.f.: 165-166 C.

R_f = 0.11 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1), 0.53 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.52-7.42 (2H, m, Ph), 7.42-7.30 (3H, m, Ph), 5.10 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.5 Hz, OCH₂Ph), 5.05 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.5 Hz, OCH₂Ph), 4.27 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-5), 3.75 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, H-10), 3.67 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, H-10'), 3.62 (1H, t, *J* = 1.5 Hz, H-6), 3.48 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-9), 3.44 (1H, dd, *J* = 3.7, 1.5 Hz, H-8), 3.19 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3), 2.80 (1H, s ancho, HO-C(7)), 2.41 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3'), 2.28 (1H, m, HO-C(10)), 0.86 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.14 (3H, s, SiCH₃), 0.12 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.08 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.1, 134.9, 129.0, 128.6, 128.4, 78.9, 77.9, 72.1, 66.0, 65.3, 63.9, 61.1, 56.3, 38.6, 26.1, 18.1, 0.2, -2.8, -5.4.

IR (film): ν 3435, 2956, 2927, 2894, 2855, 1763, 1655 (débil), 1478, 1461, 1411, 1385, 1367, 1302, 1253, 1139, 1099, 1089, 963, 940, 911, 879, 835, 777, 755 cm⁻¹.

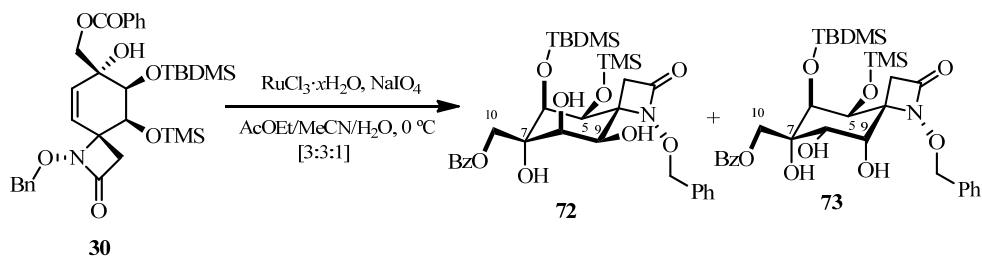
LRMS (API-ES⁺): *m/z* 1069 (2M+Na)⁺, 596 (M+73)⁺, 546 (M+Na)⁺, 524 (M+H)⁺.

A.E. (C₂₅H₄₁NO₇Si₂): Hallado: C, 57.40; H, 8.07; N, 2.79.

Calculado: C, 57.33; H, 7.89; N, 2.67.

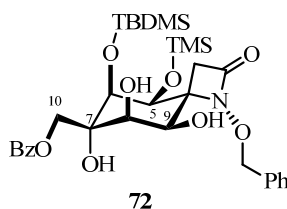
Síntesis del equivalente sintético del cianobenciliden-acetal **8**

Dihidroxilación de *rac*-(1_R,4_R,5_S,6_S,7_R)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**30**)



A una disolución de *rac*-(1_R,4_R,5_S,6_S,7_R)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**30**) (73 mg, 0.119 mmol) en CH₃CN (0.9 ml) y AcOEt (0.9 ml), se adicionó a 0 °C una disolución de tricloruro de rutenio hidratado (6 mg, 0.030 mmol) y peryodato sódico (31 mg, 0.143 mmol) en H₂O (0.3 ml). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a 0 °C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se añadió NaHSO₃ sat. (2 ml) y AcOEt (2 ml), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:2) obteniéndose *rac*-(1_R,4_R,5_S,6_S,7_S,8_R,9_R)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**72**) (45 mg, rto. 58%), como un aceite incoloro, y *rac*-(1_R,4_R,5_S,6_S,7_S,8_S,9_S)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**73**) (22 mg, rto. 29%), como un sólido blanco.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*terc*-butil-dimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (72)**



$R_f = 0.41$ (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.06 (2H, dm, $J = 7.2$ Hz, Bz), 7.64 (1H, tm, $J = 7.6$, Bz), 7.50 (2H, ddm, $J = 7.6$, 7.2 Hz, Bz), 7.46-7.40 (2H, m, Ph), 7.40-7.33 (3H, m, Ph), 5.30 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.0$ Hz, OCH_2Ph), 5.10 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.0$ Hz, OCH_2Ph), 4.82 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10), 4.67 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10'), 4.44 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-5), 4.13 (1H, dd, $J = 9.5$, 3.5 Hz, H-9), 4.04 (1H, dd, $J = 2.7$, 1.8 Hz, H-6), 3.89 (1H, ddd, $J = 10.7$, 3.5, 1.8 Hz, H-8), 3.57 (1H, d, $J = 10.7$ Hz, HO-C(8)), 3.28 (1H, s, HO-C(7)), 2.93 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.7$ Hz, H-3), 2.68 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.7$ Hz, H-3'), 2.48 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, HO-C(9)), 0.92 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.26 (3H, s, SiCH_3), 0.17 (12H, s, 4 x SiCH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 168.0, 164.2, 135.5, 133.9, 129.8, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 78.6, 78.3 (C-6), 74.8 (C-8), 72.6 (C-7), 70.1 (C-4), 67.5 (C-10), 67.0 (C-5), 66.2 (C-9), 34.1 (C-3), 26.0, 18.3, 0.4, -3.0, -5.9.

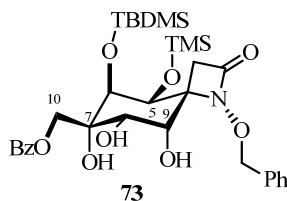
IR (film): ν 3452, 2955, 2934, 2855, 1747, 1725, 1602, 1584, 1452, 1378, 1275, 1252, 1110, 1089, 930, 910, 880, 840, 781, 754, 712 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1313 ($2\text{M}+\text{Na}$)⁺, 1290 ($2\text{M}+\text{H}$)⁺, 718 ($\text{M}+73$)⁺, 668 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 646 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 628 ($\text{M}-17$)⁺.

A.E. ($\text{C}_{32}\text{H}_{47}\text{NO}_9\text{Si}_2$): Hallado: C, 59.60; H, 7.45; N, 2.34.

Calculado: C, 59.51; H, 7.33; N, 2.17.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*terc*-butil-dimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (73)**



P.f.: 185-186 °C.

R_f = 0.27 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):⁴³ δ 8.05 (2H, dm, *J* = 7.5 Hz, Bz), 7.63 (1H, tm, *J* = 7.7 Hz, Bz), 7.49 (2H, dd, *J* = 7.7, 7.5 Hz, Bz), 7.44-7.39 (2H, m, Ph), 7.37-7.29 (3H, m, Ph), 5.21 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, OCH₂Ph), 5.13 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, OCH₂Ph), 5.04 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.4 Hz, H-10), 4.74 (1H, s ancho, HO-C(7)), 4.63 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-5), 4.43 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.4 Hz, H-10'), 4.13 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, HO-C(9)), 4.08 (1H, d, *J* = 2.6 Hz, H-6), 4.00 (1H, dd, *J* = 10.2, 3.4 Hz, H-9), 3.82 (1H, dd, *J* = 10.0, 3.4 Hz, H-8), 3.00 (1H, d ancho, *J* = 10.0 Hz, HO-C(8)), 3.18 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.5 Hz, H-3), 2.20 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.5 Hz, H-3'), 0.91 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.21 (3H, s, SiCH₃), 0.11 (3H, s, SiCH₃), 0.10 (9H, s, Si(CH₃)₃).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 169.2, 164.7, 135.3, 134.0, 133.7, 129.9, 129.2, 128.7, 128.4, 128.3, 80.0 (C-7), 78.9, 78.5 (C-9), 75.0 (C-6), 69.3 (C-4), 67.3 (C-10), 66.2 (C-8), 64.1 (C-5), 38.4 (C-3), 26.2, 18.4, 0.5, -2.7, -6.0.

IR (film): ν 3401, 3065, 3028, 2955, 2927, 2900, 2858, 1750, 1724, 1603, 1589, 1452, 1411, 1389, 1367, 1274, 1255, 1098, 973, 929, 879, 836, 805, 779, 755, 711 cm⁻¹.

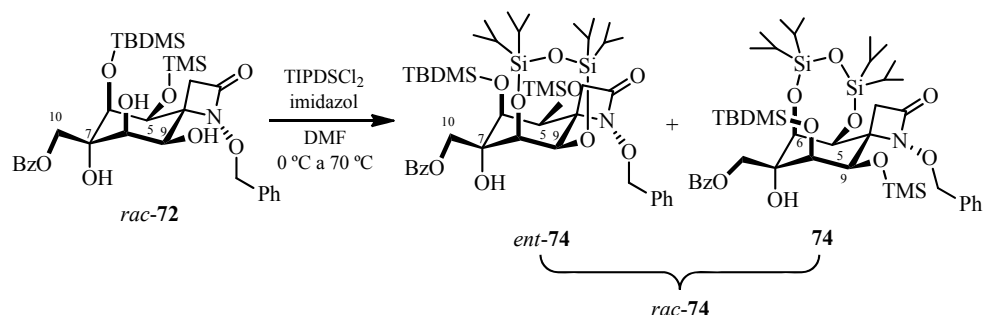
⁴³ En algunas ocasiones, dependiendo de la concentración de la muestra y de la cantidad de agua que contenga el CDCl₃ empleado como disolvente, se observa una variación en la multiplicidad de las señales de ¹H-RMN que aparecen a δ 3.82 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-8) y 3.00 (1H, s ancho, HO-C(8)).

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1313 ($2M+Na$)⁺, 718 ($M+73$)⁺, 668 ($M+Na$)⁺, 646 ($M+H$)⁺.

A.E. (C₃₂H₄₇NO₉Si₂): Hallado: C, 59.63; H, 7.47; N, 2.38.

Calculado: C, 59.51; H, 7.33; N, 2.17.

Protección de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (72**)**⁴⁴



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-6-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-7,8,9-trihidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**72**) (371 mg, 0.574 mmol) e imidazol (172 mg, 2.526 mmol) en DMF (2.4 ml) se adicionó a 0 °C 1,3-dicloro-1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano (210 μ l, 0.631 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente añadiendo imidazol (2.526 mmol) y TIPDSCl₂ (0.631 mmol) cada 24 horas, hasta un total de tres adiciones. Tras la última adición la mezcla se calentó a 70 °C durante 3 días. Pasado este tiempo, se añadió H₂O (3 ml) y AcOEt (3 ml), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 3 ml). La fase

⁴⁴ De ahora en adelante, para facilitar la discusión de los resultados, el compuesto racémico tetrasililado **74** y sus derivados se representarán gráficamente mediante la figura del enantiómero que dispone el grupo TIPDS a la derecha del plano definido por el anillo de β -lactama cuando se observa la molécula por su cara α , es decir, orientando el nitrógeno por debajo del plano molecular. Además, estas estructuras (ciclohexano-espiro- β -lactamas pentahidroxiladas) se numerarán de forma que los números localizadores más bajos correspondan a los carbonos que soportan dicho grupo protector.

orgánica se lavó sucesivamente con CuSO₄ sat. (4 ml) y NaCl sat. (2 x 4 ml), se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 12:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-9-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**74**) (437 mg, rto. 86%),⁴⁵ como un sólido blanco.

P.f.: 200-201 °C.

R_f = 0.48 (TLC, hexano/AcOEt, 5:1); 0.61 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.04 (2H, dm, *J* = 7.6 Hz, Bz), 7.63 (1H, tm, *J* = 7.3 Hz, Bz), 7.49 (2H, ddm, *J* = 7.6, 7.3 Hz, Bz), 7.42-7.28 (5H, m, Ph), 5.36 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 5.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 4.71 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10), 4.68 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-5), 4.63 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10'), 4.38 (1H, dd, *J* = 3.9, 1.0 Hz, H-6), 4.36 (1H, d, *J* = 3.2 Hz, H-9), 3.99 (1H, dd, *J* = 3.2, 1.0 Hz, H-8), 3.01 (1H, s, OH), 2.97 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.1 Hz, H-3), 2.92 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.1 Hz, H-3'), 1.15-0.94 (28H, m, TIPDS), 0.90 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.19 (3H, s, SiCH₃), 0.15 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.11 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (50 MHz, CDCl₃): δ 167.8, 164.3, 135.3, 133.7, 129.7, 129.1, 128.7, 128.4, 128.35, 128.2, 78.0, 76.6 (C-8), 75.3 (C-6), 74.8 (C-7), 70.6 (C-4), 69.2 (C-5), 68.2 (C-10), 67.4 (C-9), 34.8 (C-3), 26.3, 18.7, 17.8, 17.7, 17.4, 17.3, 17.25, 17.0, 16.9, 13.3, 13.0, 12.8, 12.4, 0.6, -3.3, -5.5.

IR (film): ν 3381, 3065, 3028, 2947, 2891, 2867, 1743, 1724 (hombro), 1603, 1584, 1464, 1411, 1387, 1367, 1317, 1278, 1253, 1167, 1111, 1000, 963, 919, 886, 835, 800, 754, 716, 695 cm⁻¹.

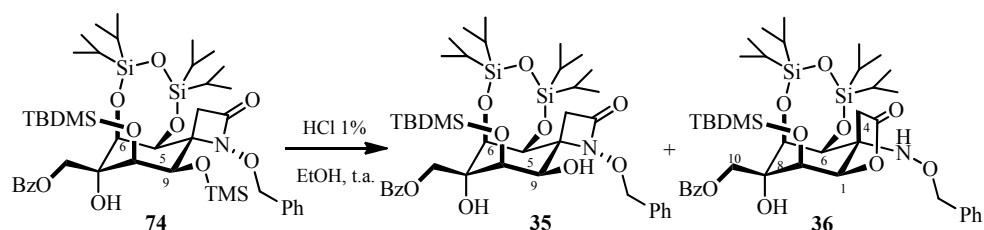
⁴⁵ Cuando la mezcla de reacción no se calienta a 70 °C la conversión no es total. Después de tres días temperatura ambiente, se recupera el 33% del diol de partida **72** inalterado y el rendimiento del derivado tetrasililado **74** disminuye al 57%.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1797 (2M+Na)⁺, 960 (M+73)⁺, 910 (M+Na)⁺, 888 (M+H)⁺.

A.E. (C₄₄H₇₃NO₁₀Si₄): Hallado: C, 59.54; H, 8.39; N, 1.74.

Calculado: C, 59.49; H, 8.28; N, 1.58.

Desprotección *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropilidisiloxano-1,3-diil)-9-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**74**)

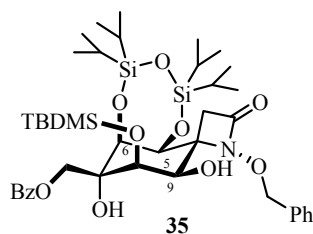


Se disolvió *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-9-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**74**) (293 mg, 0.330 mmol) en una disolución de HCl al (1% en peso en EtOH, 1.8 ml, 0.495 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, se adicionó más HCl (1% en peso en EtOH, 1.8 ml, 0.495 mmol). Después de otras 24 horas a temperatura ambiente,⁴⁶ se neutralizó el medio con una disolución acuosa de NaHCO₃ (10%) y se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**35**) (250 mg, rto. 93%), como

⁴⁶ En algunas ocasiones, para que la reacción se completara fue necesario añadir 0.5 equiv. adicionales de HCl al 1% en EtOH.

un sólido blanco de aspecto espumoso, y *rac*-(1*R*_N,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-9-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-6,7,8-trihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (**36**) (15 mg, rto. 6%), como un sólido blanco.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**35**)**



P.f.: 87-89 °C.

R_f = 0.51 (TLC, hexano/AcOEt, 2:1); 0.28 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (2H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.62 (1H, tm, *J* = 7.3 Hz, Bz), 7.48 (2H, ddm, *J* = 7.3, 7.1 Hz, Bz), 7.45-7.35 (5H, m, Ph), 5.07 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.99 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.67 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10), 4.58 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10'), 4.52 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-5), 4.35 (1H, dd, *J* = 4.0, 0.9 Hz, H-6), 4.03 (1H, dd, *J* = 3.4, 0.9 Hz, H-8), 3.86 (1H, dd, *J* = 5.0, 3.4 Hz, H-9), 2.98 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.1 Hz, H-3), 2.89 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.1 Hz, H-3'), 2.70 (1H, s, HO-C(7)), 1.62 (1H, d, *J* = 5.0 Hz, HO-C(9)), 1.14-0.97 (28H, m, TIPDS), 0.87 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.12 (3H, s, SiCH₃), 0.07 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 168.4, 167.6, 136.2, 133.7, 129.6, 129.2, 128.9, 128.75, 128.7, 128.6, 78.5, 75.3 (C-6), 74.9 (C-8), 74.8 (C-7), 69.8 (C-4), 68.8 (C-

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 176.1 (C-3), 167.3, 137.6, 133.7, 129.6, 129.1, 128.6, 128.3, 127.9, 127.7, 77.2 (C-1), 76.8, 75.6 (C-8), 73.5 (C-7), 71.6 (C-9), 67.9 (C-10), 67.8 (C-5), 67.5 (C-6), 36.1 (C-4), 25.9, 18.0, 17.65, 17.6, 17.5, 17.35, 17.3, 17.2, 17.1, 16.7, 13.9, 13.1, 12.7, 11.8, -4.2, -4.8.

IR (film): ν 3568 (hombro), 3397 (ancha), 2946, 2890, 2867, 1760, 1724, 1601, 1463, 1386, 1316, 1273, 1148, 1125, 1099, 1068, 997, 919, 883, 838, 778, 694 cm^{-1} .

LRMS (API-ES $^+$): m/z 862 ($\text{M}+2\text{Na}$) $^+$, 816 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

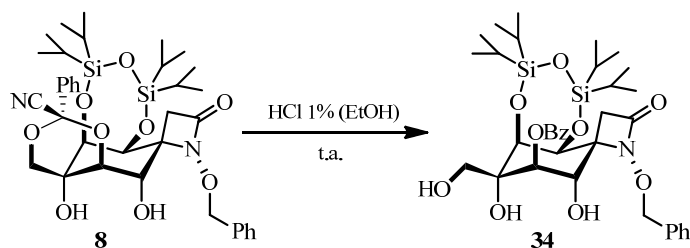
LRMS (EI): m/z 758 (M^+-57 , 7), 693 (1), 650 (1), 636 (2), 618 (1), 610 (1), 544 (1), 529 (1), 513 (2), 483 (3), 395 (2), 365 (5), 339 (17), 289 (6), 261 (8), 179 (9), 163 (4), 147 (5), 135 (6), 105 (100), 91 (76), 77 (8).

A.E. ($\text{C}_{41}\text{H}_{65}\text{NO}_{10}\text{Si}_3$): Hallado: C, 60.46; H, 8.22; N, 2.01.

Calculado: C, 60.33; H, 8.03; N, 1.72.

1.2.1.6. Reactividad del cianobenciliden acetal **8**

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**34**)



A una suspensión de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (35 mg, 0.049 mmol) en una disolución de HCl (1% en peso en EtOH, 0.8 ml) se adicionó, THF (0.9 ml) y la disolución transparente se agitó a temperatura ambiente durante 4 días. Pasado

este tiempo, se añadió una disolución de NaHCO_3 (10%, 1 ml), otra de tampón NaHPO_4 (0.1 M, 2 ml) y CH_2Cl_2 (3 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 3 ml) y con AcOEt (3 x 1 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/ AcOEt , 3:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**34**) (14 mg, 40%) como un aceite amarillo y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (17 mg, 49%).

R_f = 0.30 (TLC, Hex: AcOEt 1:1). Aceite amarillo.

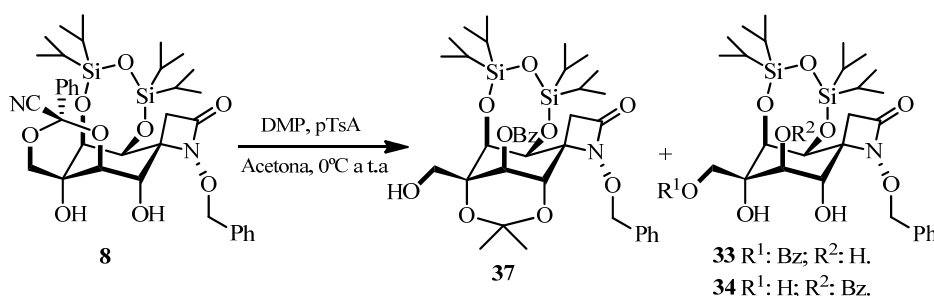
¹**H-RMN** (300 MHz, CDCl_3): δ 8.09- 8.06 (2H, m, Bz), 7.64- 7.59 (1H, m, Bz), 7.49- 7.31 (7H, m, Bz y Ph), 5.16 (1H, *parte A sist. AB*, J = 10.4 Hz, OCH_2Ph), 5.10 (1H, *parte B sist. AB*, J = 10.4 Hz, OCH_2Ph), 4.92 (1H, *parte X sist XAB*, J = 2.7 Hz, C(10)-OH), 4.87 (1H, *parte A sist. AB*, J = 12.1 Hz, CH_2OH), 4.78 (1H, d, J = 4.9 Hz), 4.74 (1H, s. ancho), 4.26 (1H, t, J = 2.2 Hz), 4.11 (1H, dd, J = 8.5, 2.7 Hz), 4.11 (1H, *parte A sist. ABX*, J = 8.5, 2.7 Hz, H-10, CH_2OH), 3.79 (1H, *parte B sist. ABX*, J = 8.5 Hz, H-10', CH_2OH), 3.45 (1H, s. ancho, OH), 3.27 (1H, *parte A sist. AB*, J = 13.8 Hz, H-3), 2.54 (1H, *parte B sist. AB*, J = 13.8 Hz, H-3'), 1.00-0.88 (28H, m, TIPDS).

¹³**C-RMN** (75 MHz, CDCl_3): δ 168.3, 166.6, 135.3, 133.8, 130.0, 129.9, 129.3, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.5, 128.4, 128.3, 78.7 (OCH_2Ph), 78.3, 75.3, 75.1, 72.6, 68.1, 67.7, 64.1, 38.3 (C-3), 17.3, 17.2, 17.1, 17.05, 17.03, 17.0, 16.9, 13.35, 13.32, 13.19, 13.12.

IR (KBr): ν 3402, 3061, 3032, 2945, 2868, 1752, 1602, 1582, 1461, 1453, 1375, 1314, 1277, 1085, 1054, 886, 861, 757, 712 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 743 (*M*+Na+H₂O+H)⁺, 722 (*M*+H₂O+3H)⁺, 721 (*M*+H₂O+2H)⁺, 720 (*M*+H₂O+H)⁺, 703 (*M*+2H)⁺, 702 (*M*+H)⁺.

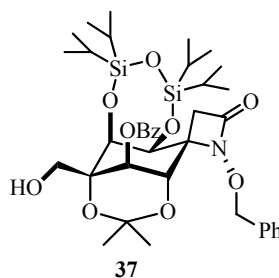
Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-7,9-*O*-isopropiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (37)



A una disolución de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (200 mg, 0.281 mmol) en acetona (5 ml) se adicionó, a 0°C, 2,2 dimetoxipropano (73 µl) y ácido *p*-toluensulfónico y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 día. Pasado este tiempo, se añadió, a 0°C, una disolución tampón NaHPO₄ (0.1 M, 3 ml) y AcOEt (3 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 6:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-7,9-*O*-isopropiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**37**) (50 mg, rto. 24%), *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]

nonan-2-ona (**33**) (60 mg, rto. 29%) como un aceite transparente y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**34**) (46 mg, rto. 23%) como un aceite amarillo.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(Benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-(hidroximetil)-7,9-*O*-isopropiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**37**)**

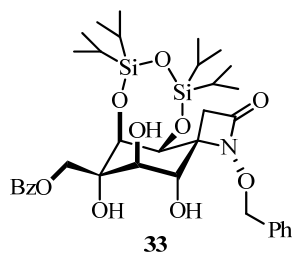


$R_f = 0.28$ (TLC, Hex: AcOEt 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (2H, m, Bz), 7.62- 7.57 (1H, m, Bz), 7.42- 7.32 (7H, m, Bz y Ph), 5.34 (1H, s. ancho), 5.15 (2H, s. ancho, OCH₂Ph), 4.92 (1H, s. ancho), 4.34 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 9.1$ Hz, CH₂OH), 4.14- 4.09 (1H, m, *parte B sist. AB*), 4.02 (1H, s. ancho), 3.63 (1H, s. ancho), 3.26 (1H *parte A sist. AB*, $J = 12.6$ Hz, H-3), 2.24 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.6$ Hz, H-3'), 1.54 (3H, s, OCH₃), 1.50 (3H, s, OCH₃), 1.13- 1.03 (28H, m, TIPDS).

LRMS (API-ES⁺): m/z 1508 (2M+Na+3H)⁺, 1507 (2M+Na+2H)⁺, 1483 (2M+H)⁺, 766 (M+Na+2H)⁺, 765 (M+Na+H)⁺, 764 (M+Na)⁺, 744 (M+3H)⁺, 743 (M+2H)⁺, 742 (M+H)⁺.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (33)**



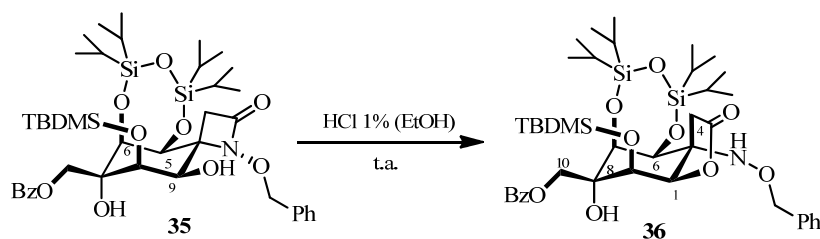
$R_f = 0.26$ (TLC, Hex: AcOEt 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.09- 8.06 (2H, m, Bz), 7.63-7.57 (1H, m, Bz), 7.48- 7.32 (7H, m, Bz y Ph), 5.24 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, OCH₂Ph), 5.09 (1H, s ancho, H-5), 5.09 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, OCH₂Ph), 4.82 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.7$ Hz, CH₂Bz, H-10), 4.68 (2H, s ancho, H-6, C(7)-OH), 4.54 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.7$ Hz, CH₂Bz, H-10'), 4.32 (1H, dd, $J = 4.7$, 3.3 Hz, H-9), 4.03 (1H, dd, $J = 10.0$, 1.7 Hz, H-8), 3.57 (1H, d, $J = 4.9$ Hz, C(9)-OH), 3.47 (1H, d, $J = 10.3$ Hz, C(8)-OH), 3.13 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.4$ Hz, H-3), 2.56 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.4$ Hz, H-3'), 1.12- 1.01 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 167.2 (COPh), 164.4 (C-2), 134.8, 133.5, 129.7, 129.2, 128.1, 128.7, 128.5, 79.2 (CH₂Ph), 78.7 (C-9), 77.0 (C-6), 74.7 (C-7), 71.6 (C-8), 67.9 (C-10), 66.8 (C-5), 66.3 (C-4), 38.4 (C-3), 30.9, 17.6, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 14.1, 14.0, 13.3, 13.0.

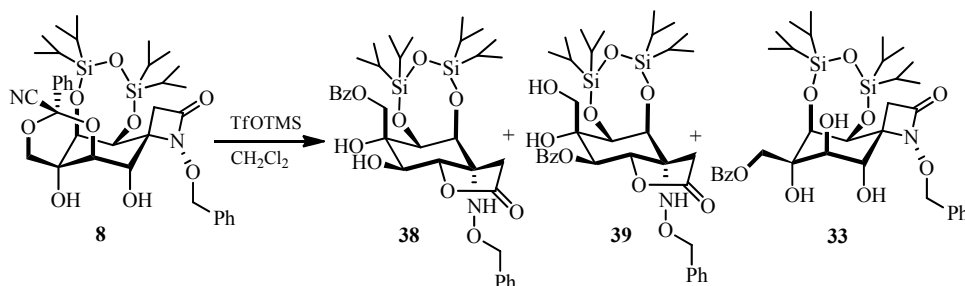
LRMS (API-ES⁺): m/z 1448 (2M+2Na)⁺, 1427 (2M+2H+Na)⁺, 1425 (2M+Na)⁺, 724 (M+Na)⁺, 704 (M+3H)⁺, 703 (M+2H)⁺, 702 (M+H)⁺.

Síntesis de *rac*-(1*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-9-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-6,7,8-trihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (36)



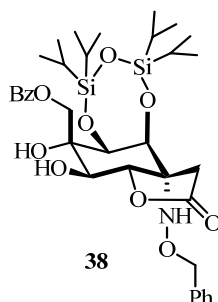
Se disolvió *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**35**) (40 mg, 0.049 mmol) en una disolución de HCl (1% en peso en EtOH, 0.25 ml, 0.073 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 10 días. Pasado este tiempo, se neutralizó el medio con una disolución tampón Na₂HPO₄ (0.1 M) y se extrajo la mezcla con CH₂Cl₂ (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-9-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-6,7,8-trihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]nonan-3-ona (**36**) (18 mg, rto. 45%) y la β-lactama de partida **35** (17 mg, 42%).

Síntesis de *rac*-(1*S*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-6,7,8,9-tetrahidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicciclo[4.3.0]nonan-3-ona (38**)**



A una disolución de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (70 mg, 0.098 mmol) en CH₂Cl₂ (1.5 ml) se adicionó, a 0°C, triflato de trimetilsilano (22 µl) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 día. Pasado este tiempo, se añadió, a 0°C, una disolución tampón NaHPO₄ (0.1 M, 2 ml) y CH₂Cl₂ (2ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 3:1) obteniéndose *rac*-(1*S*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-6,7,8,9-tetra-hidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetra-isopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicciclo[4.3.0]nonan-3-ona (**38**) (35mg, rto 50%), *rac*-(1*S*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(benciloxi)amino]-9-(benzoiloxi)-6,7,8-trihidroxi-8-(hidroximetil)-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicciclo[4.3.0]nonan-3-ona (**39**) (8mg, rto 12%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**33**) (20mg, rto 29%).

***rac*-(1*S*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(Benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-6,7,8,9-tetrahidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicciclo [4.3.0]nonan-3-ona (38)**



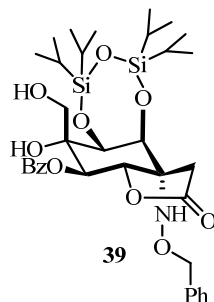
$R_f = 0.53$ (TLC, Hex: AcOEt 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.06-8.05 (2H, m, Bz), 7.59- 7.34 (8H, m, Bz y Ph), 5.52 (1H, s), 5.01 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.5$ Hz, OCOCH₂Ph), 4.81 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 4.76 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH₂Ph), 4.74 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 4.72 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.5$ Hz, OCOCH₂Ph), 4.66 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, OCH₂Ph), 4.60 (1H, d, $J = 11.7$ Hz), 4.26 (1H, dd, $J = 11.7$, 3.5 Hz), 3.70 (1H, s. ancho), 3.11 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 16.6$ Hz, H-11), 2.89 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 16.6$ Hz, H-11'), 2.78 (1H, d, $J = 3.9$ Hz), 1.11- 1.06 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 173.9 (C-3), 167.1 (COPh), 135.9, 133.2, 130.0, 129.7, 128.9, 128.8, 128.75, 128.72, 128.6, 128.5, 128.45, 128.42, 128.34, 128.31, 128.2, 79.6 (C-1), 78.4 (C-8), 77.6 (C-7), 77.1 (OCH₂Ph), 71.6 (C-9), 69.5 (C-6), 68.3 (C-5), 64.1 (C-10), 36.2 (C-4), 17.5, 17.4, 17.3, 17.23, 17.21, 17.1, 17.08, 17.05, 16.9, 14.5, 14.2, 13.4, 13.0.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1448 (2M+2Na)⁺, 1426 (2M+Na+H)⁺, 1403 (2M+H)⁺, 727 (M+Na+3H)⁺, 724 (M+Na)⁺, 704 (M+3H)⁺, 703 (M+2H)⁺, 702 (M+H)⁺.

***rac*-(1*S*,5*R*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-5-[(Benciloxi)amino]-9-(benzoiloxi)-6,7,8-trihidroxi-8-(hidroximetil)-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicclo [4.3.0]nonan-3-ona (39)**



$R_f = 0.24$ (TLC, Hex: AcOEt 4:1).

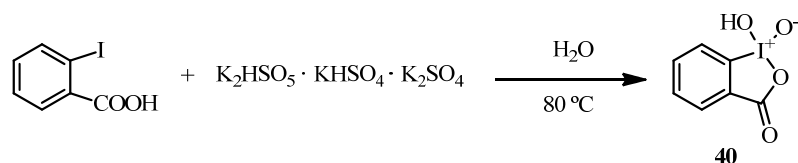
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 8.06- 8.04 (2H, m, Bz), 7.60- 7.56 (2H, m, Ph), 7.46- 7.42 (2H, m, Ph), 7.39- 7.34 (2H, m, Ph), 7.30- 7.28 (2H, m, Ph), 5.84 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-9), 5.66 (1H, s, NH), 4.88 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-7), 4.85 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-1) 4.81 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.9$ Hz, OCH_2Ph), 4.79 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-6), 4.76 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.9$ Hz, OCH_2Ph), 4.21 (1H, s, C(8)-OH), 4.13 (1H, dd, $J = 11.2, 6.3$ Hz, H-4, H-10), 3.99 (1H, dd, $J = 11.2, 7.8$ Hz, CH_2OH , H-10'), 3.11 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 16.6$ Hz, H-4), 2.89 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 16.6$ Hz, H-4'), 2.84 (1H, d, $J = 7.1$ Hz), 1.10- 1.00 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 173.6 (C-3), 165.6 (COPh), 135.7, 133.4, 129.9, 129.3, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 79.0 (C-7), 77.2 (OCH_2Ph), 77.1 (C-8), 77.0 (C-1), 71.7 (C-9), 69.5 (C-6), 68.7 (C-5), 62.6 (C-10), 36.0 (C-4), 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 16.9, 14.1, 13.3, 13.1, 12.9.

IR (KBr): ν 3400, 2950, 2862, 1794, 1726, 1633, 1452, 1288, 1265, 1094, 1069, 1007, 916, 882, 695 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1405 ($2\text{M}+3\text{H}$)⁺, 749 ($\text{M}+2\text{Na}+2\text{H}$)⁺, 747 ($\text{M}+2\text{Na}$)⁺, 725 ($\text{M}+\text{H}+\text{Na}$)⁺, 724 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 704($\text{M}+3\text{H}$)⁺, 703($\text{M}+2\text{H}$)⁺, 702 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Síntesis de 1-hidroxi-1λ⁵,2-benzoyodoxol-1,3-diona (IBX, 40)⁴⁷

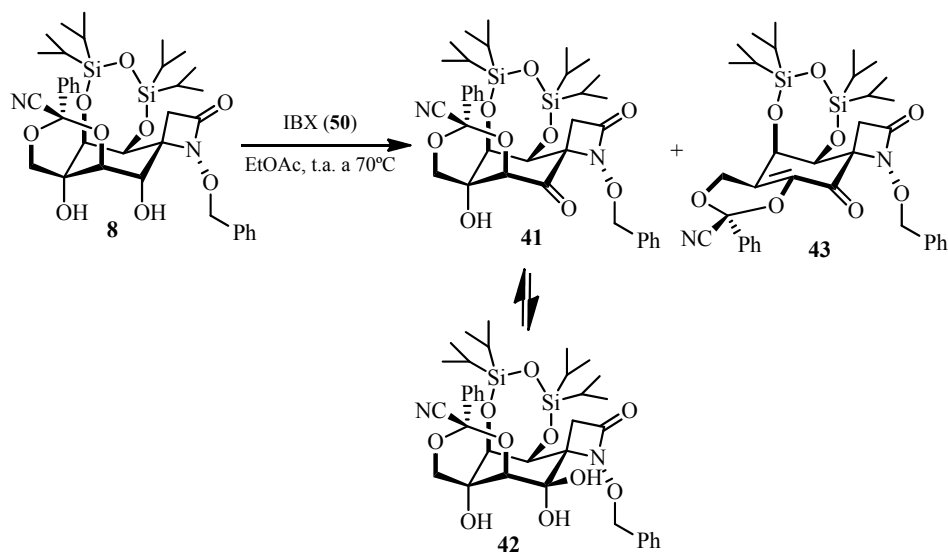


A una disolución de ozono (13.77 g, 22.41 mmol) en 80 ml de agua milli-Q, se adicionó, a temperatura ambiente, 1.85 g de ácido *o*-yodobenzoico (1.85 g, 7.47 mmol) y se formó una suspensión blanca que se calentó a 80 °C durante 3.5 horas. Pasado este tiempo, la suspensión se atemperó y a continuación se enfrió a 0°C durante 30 minutos. Se filtró a vacío en placa filtrante n°3 y se lavó con agua milli-Q, a 0 °C (6 x 10 ml) y con acetona, a 0 °C (2 x 10 ml). El sólido obtenido se sonicó durante 1 hora en cloroformo (10 ml). A continuación se filtró y el sólido obtenido se sonicó de nuevo durante 1 hora en cloroformo (10 ml). Pasado este tiempo la suspensión resultante se filtra a vacío en placa filtrante n° 3 y se lavó con agua milli-Q a 0 °C (6 x 10 ml) y con acetona a 0 °C (2 x 10 ml) obteniéndose 1-hidroxi-1λ⁵,2-benzoyodoxol-1,3-diona (**40**) (1.83 g, 100 rto %) como un sólido blanco.

⁴⁷ Frigerio, M.; Santagostino, M.; Sputore, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4537-4538. Dess, D. M.; Martin, J. C.; *J. Am. Chem.* **1991**, *113*, 7277-7287. Katritzky, A. R.; Duell, B. L.; Gallos, J. K. *Org. Magn. Reson.* **1989**, *27*, 1007-1011.

Síntesis de la cianobencilidenona **41** y su hidrato **42**

Método A

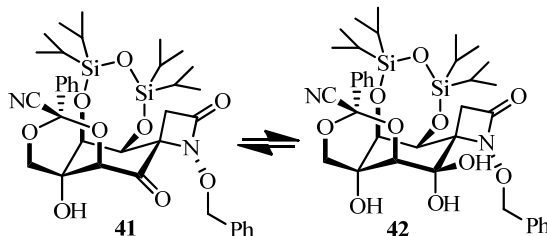


A una disolución de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraiso-propildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (200 mg, 0.242 mmol) en AcOEt (8 ml) se adicionó, a temperatura ambiente, IBX (**40**) (237 mg)⁴⁸ y se formó una suspensión blanca que se calentó a 70°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, la suspensión se filtró a vacío, a través de *Celita*[®], en placa filtrante n°3. De la disolución resultante se eliminó el disolvente a presión reducida. A la suspensión que se formó del sólido resultante en AcOEt (8 ml), se añadió, a temperatura ambiente, IBX (237 mg) y la suspensión blanca se calentó a 70°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, la suspensión resultante se filtró a vacío, a

⁴⁸ Nigierio. M.; Santagostino. M. *Tetrahedron* **1994**, 35, 8019-8022. Corey. E. J.; Palani. A. *Tetrahedron* **1995**, 20, 3485-3488. Nicolau. K. C.; Zhong. Y. L.; Baran. P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 122, 7596-7597. Fogerio. M.; Santagostino. M.; Sputore. S.; Palmasino. G. *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7272-7276. Nicolau. K. C.; Gray. D. L. F.; Montagnon. T.; Harrison. S. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 996-1000.

través de *Celita*[®], en placa filtrante nº3. De la disolución resultante se eliminó el disolvente a presión reducida. A la suspensión que se formó del sólido resultante en AcOEt (8 ml), se añadió, a temperatura ambiente, IBX (237 mg) y la suspensión blanca se calentó a 70°C durante 3 horas. Pasado este tiempo, la suspensión resultante se filtró a vacío, a través de *Celita*[®], en placa filtrante nº3. De la disolución resultante se eliminó el disolvente a presión reducida. El sólido resultante se disolvió con AcOEt (10 ml) y la suspensión que se formó se lavó con agua (2 x 10 ml). Se separaron las fases. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Al sólido resultante se le añadió eter etílico (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. Al sólido resultante se le añadió tolueno (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. Al sólido resultante se le añadió, de nuevo, eter etílico (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. Al sólido resultante se le añadió, otra vez, tolueno (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. Al sólido resultante se le añadió, por última vez, eter etílico (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**43**) (20 mg, rto. 10%) y una mezcla de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[(8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-heptahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**42**) ([10:1], 179 mg, rto. 90%) como un sólido blanco.

Mezcla [10:1] *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-aza-espiro[3.5]nonano-2,9-diona (41) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[(8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-heptahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (42)



P.f: 170-172°C.

R_f = 0.35 (TLC, Hex: AcOEt 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.60- 7.55 (2H (41) + 2H (42), m, Ph), 7.45- 7.30 (8H (41) + 8H (42), m, Ph), 5.20 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.6 Hz, OCH₂Ph, 42), 5.16 (2H, s, OCH₂Ph, 41), 5.03 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.6 Hz, OCH₂Ph, 42), 4.84 (1H, d, *J* = 3.5 Hz, H-5, 42), 4.78 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-5, 41), 4.62 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8, 41), 4.57 (1H, dd, *J* = 3.7, 1.5 Hz, H-6, 41), 4.54 (1H, s, ancho, 42), 4.46 (1H, dd, *J* = 3.5, 1.3 Hz, H-6, 42), 4.38 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.1 Hz, H-10, 41), 4.26 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.3 Hz, H-10, 42), 4.19 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-8, 42), 4.16 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.1 Hz, H-10', 41), 4.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.3 Hz, H-10', 42), 3.36 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3, 41), 2.98 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3, 42), 2.76 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3', 42), 2.64 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.8 Hz, H-3', 41), 1.13- 1.01 (28H (41) + 28H (42), m, TIPDS).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 198.5, 163.9, 135.4, 134.8, 130.6, 129.2, 128.8, 128.4, 128.3, 125.5, 114.1, 94.7, 81.2, 78.7, 76.5, 73.0, 70.5, 68.7, 65.2, 38.6, 17.8, 17.4, 17.3, 17.0, 16.9, 16.8, 16.7, 16.6, 13.9, 13.2, 13.0, 12.8.

IR (KBr): ν 3413, 3061, 3032, 2947, 2890, 2869, 2659, 2295, 2204, 1955, 1760, 1632, 1463, 1364, 1227, 1157, 1110, 999, 886, 799, 695 cm^{-1} .

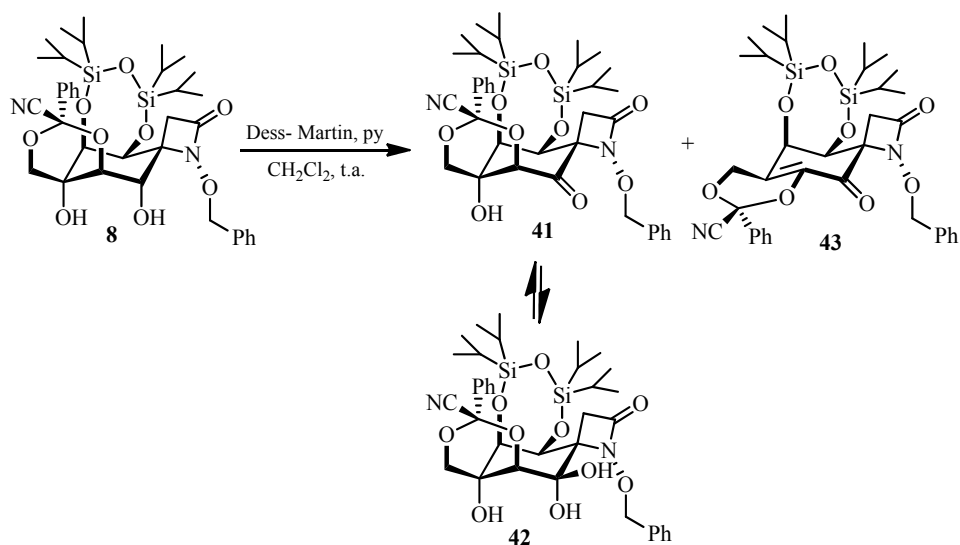
LRMS (API-ES⁺): m/z 754 ($\text{M}+2\text{Na}$, **41**)⁺, 731 ($\text{M}+\text{Na}$, **41**)⁺, 726 (M^+ , **42**), 728 ($\text{M}+2\text{H}$, **42**)⁺, 708 (M^+ , **41**).

IR (KBr): ν 3451, 2946, 2889, 2862, 2218, 1748, 1631, 1462, 1389, 1278, 1248, 1154, 1099, 1055, 922, 883, 855, 804, 744, 695 cm^{-1} .

De las distintas mezclas de hidrato **42** y cetona **41** los datos asignados a la cetona **41** fueron las siguientes:

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.60- 7.55 (2H, m, Ph (**41**)), 7.45- 7.30 (8H, m, Ph (**41**)), 5.16 (2H, s, OCH_2Ph , **41**), 4.78 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-5, **41**) 4.62 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-8, **41**), 4.57 (1H, dd, $J = 3.7, 1.5$ Hz, H-6, **41**), 4.38 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10, **41**), 4.16 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10', **41**), 3.36 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.8$ Hz, H-3, **41**), 2.64 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.8$ Hz, H-3', **41**) 1.13- 1.01 (28H, m, TIPDS (**41**)).

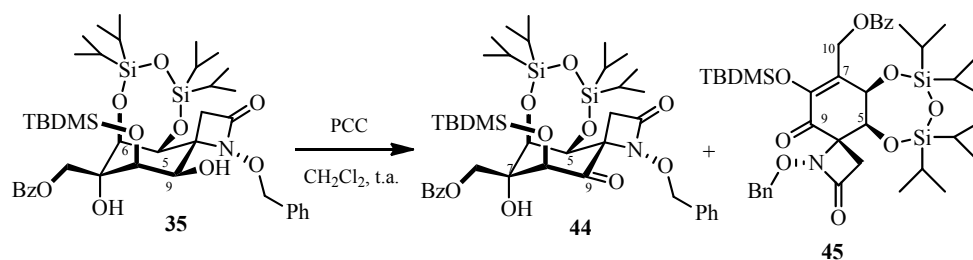
LRMS (API-ES⁺): m/z 754 ($\text{M}+2\text{Na}$, **41**)⁺, 731 ($\text{M}+\text{Na}$, **41**)⁺, 708 (M^+ , **41**).

Método B

A una disolución del triacetoxiperiodinano (reactivo *Dess-Martin* 0.3 M en CH₂Cl₂, 415 mg, 0.979 mmol) en CH₂Cl₂ (9 ml) se añadió a temperatura ambiente piridina (80 μ l, 78 mg, 0.979 mmol) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (464 mg, 0.653 mmol) en CH₂Cl₂ (9 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Pasado este tiempo, el bruto de reacción se lavó con CuSO₄ sat. (1 x 7 ml) y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. Se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**43**) (17 mg, rto. 10%) y una mezcla de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,

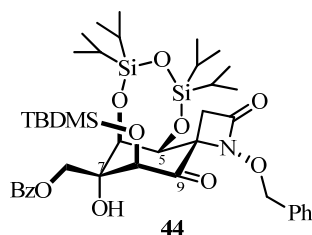
4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[(8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,9,10-hepta-hidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**42**) ([4:1], 255 mg, rto. 55%) como un sólido blanco.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (44**)**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**35**) (78 mg, 0.096 mmol) en CH_2Cl_2 (1.2 ml) se adicionó PCC (30 mg, 0.144 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 20 horas. Pasado este tiempo, se añadió un poco de *Celita*[®] y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 10:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**44**) (74 mg, rto. 95%), como un sólido blanco, y *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**45**) (2 mg, rto. 3%), como otro sólido blanco.

***rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metiloxi]-8-[(*terc*-metil-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (44)**



P.f.: 163-164 °C.

R_f = 0.53 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (2H, dm, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.64 (1H, tm, *J* = 7.3 Hz, Bz), 7.49 (2H, ddm, *J* = 7.3, 7.1 Hz, Bz), 7.44-7.27 (5H, m, Ph), 5.17 (2H, s, OCH₂Ph), 4.85 (1H, d, *J* = 4.2 Hz, H-5), 4.79 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-10), 4.57 (1H, dd, *J* = 4.2, 1.3 Hz, H-6), 4.56 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-10'), 4.12 (1H, d, *J* = 1.3 Hz, H-8), 3.47 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.5 Hz, H-3), 2.95 (1H, s, OH), 2.69 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.5 Hz, H-3'), 1.18-0.94 (28H, m, TIPDS), 0.88 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.08 (3H, s, SiCH₃), 0.04 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 203.1 (C-9), 167.3, 164.7 (C-2), 135.6, 133.8, 129.7, 128.9, 128.6, 128.2, 78.6, 77.6 (C-8), 75.0 (C-7), 74.6 (C-6), 72.5 (C-4), 68.5 (C-5), 66.6 (C-10), 39.9 (C-3), 25.6, 18.0, 17.7, 17.4, 17.35, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 13.9, 13.15, 13.1, 13.05, -4.7, -5.6.

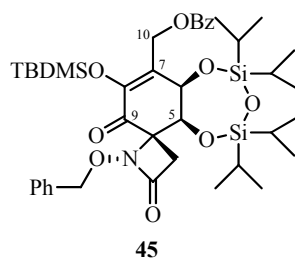
IR (film): ν 3557 (aguda), 3398 (ancha), 2947, 2889, 2862, 1763, 1725 (ancha), 1602, 1588, 1461, 1411, 1385, 1322, 1266, 1150, 1119, 1067, 998, 950, 889, 872, 840, 778 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1650 (2M+Na)⁺, 836 (M+Na)⁺, 814 (M+H)⁺.

A.E. (C₄₁H₆₃NO₁₀Si₃): Hallado: C, 60.59; H, 7.86; N, 1.95.

Calculado: C, 60.48; H, 7.80; N, 1.72.

***rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro [3.5]non-7-eno-2,9-diona (45)**



$R_f = 0.65$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (2H, dm, $J = 7.1$ Hz, Bz), 7.60 (1H, tm, $J = 7.4$ Hz, Bz), 7.45 (2H, ddm, $J = 7.4, 7.1$ Hz, Bz), 7.41-7.27 (5H, m, Ph), 5.48 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.1$ Hz, H-10), 5.23 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-6 o H-5), 5.08 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.8$ Hz, OCH₂Ph), 5.02 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.8$ Hz, OCH₂Ph), 4.83 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.1$ Hz, H-10'), 4.55 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-5 o H-6), 3.25 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.2$ Hz, H-3), 2.55 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.2$ Hz, H-3'), 1.08-0.99 (28H, m, TIPDS), 0.97 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.25 (3H, s, SiCH₃), 0.07 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 190.8, 165.9, 163.5, 146.5, 135.3, 133.4, 130.1, 130.0, 129.5, 129.45, 128.7, 128.6, 128.5, 128.45, 128.4, 78.9, 77.2, 70.4, 67.5, 59.8, 40.5, 25.8, 18.9, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 13.9, 13.6, 13.1, 13.0, -3.8, -3.9.

IR (film): ν 2954, 2928, 2867, 1790, 1727, 1697, 1631, 1463, 1381, 1258, 1159, 1093, 1068, 1023, 907, 886, 795, 761 cm⁻¹.

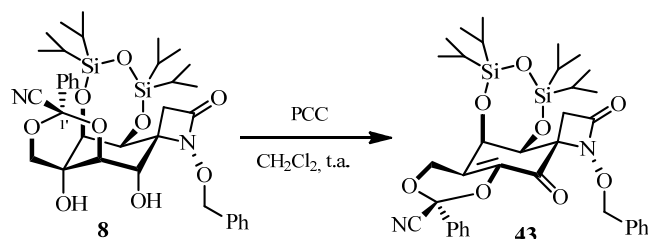
LRMS (API-ES⁺): m/z 1614 (2M+Na)⁺, 818 (M+Na)⁺, 796 (M+H)⁺.

A.E. (C₄₁H₆₁NO₉Si₃): Hallado: C, 61.96; H, 7.91; N, 2.01.

Calculado: C, 61.85; H, 7.72; N, 1.76

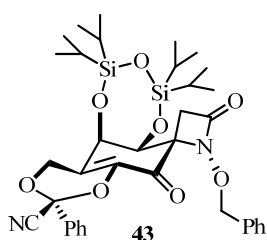
Síntesis *rac*-(1*R_N*,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (43)

Método A



A una disolución de *rac*-(1'*R*,1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**8**) (35 mg, 0.049 mmol) en CH₂Cl₂ (1 ml) se adicionó PCC (12 mg, 0.054 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. Pasado este tiempo, se añadió *Celita*[®] y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (Hex/AcOEt, 6:1) obteniéndose *rac*-(1*R_N*,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**43**) (3 mg, rto. 9%) como un aceite transparente.

***rac*-(1*R_N*,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(Benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (43)**



$R_f = 0.47$ (TLC, Hex: AcOEt 3:1). Aceite transparente.

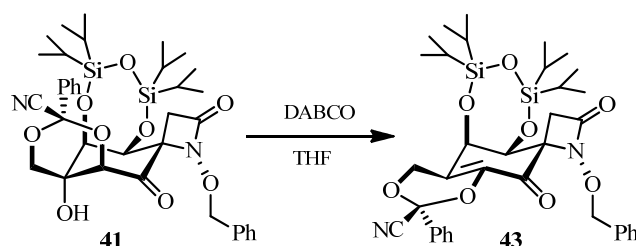
$^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.76- 7.74 (2H, m, Ph), 7.55- 7.47 (3H, m, Ph), 7.43- 7.32 (5H, m Ph), 5.10 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.1$ Hz, OCH_2Ph), 4.99 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.1$ Hz, OCH_2Ph), 4.98 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-6) 4.90 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 17.7$ Hz, H-10), 4.82 (1H. *parte B sist. AB*, $J = 17.7$ Hz, H-10'), 4.63 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-5), 3.21 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.3$ Hz, H-3'), 2.64 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.3$ Hz, H-3) 1.13- 1.01 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 185.8 (C-9), 163.6 (C-2), 141.8 (C-8), 135.2, 133.4, 131.3, 128.93, 128.9, 128.7, 128.4, 127.2 (C-7), 125.8, 114.0 (CN), 94.0 (C-1'), 79.0 (OCH_2Ph), 77.2, 69.9 (C-4), 68.2 (C-5), 66.9 (C-6), 63.3 (C-10), 40.0 (C-3), 29.7, 26.0, 17.7, 17.5, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 14.1, 13.5, 13.2, 12.7, 1.0.

IR (film): ν 3404, 3061, 3026, 2947, 2890, 2868, 2727, 2363, 2273, 1786, 1709, 1661, 1464, 1369, 1278, 1111, 1008, 939, 885, 796, 758, 695 cm^{-1} .

LRMS (API-ES^+): m/z 1403 ($2\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 715 ($\text{M}+\text{Na}+2\text{H}$) $^+$, 714 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$) $^+$, 713 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 691 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

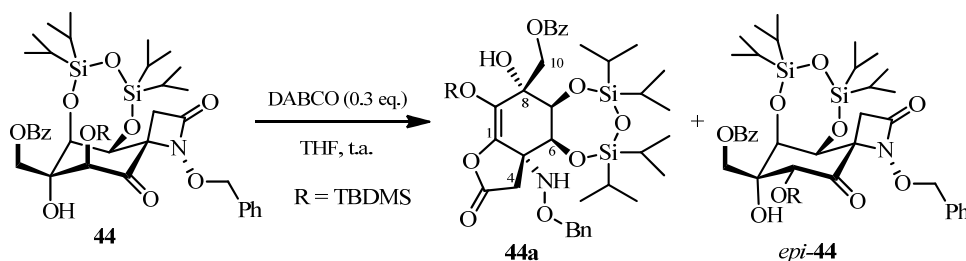
Método B



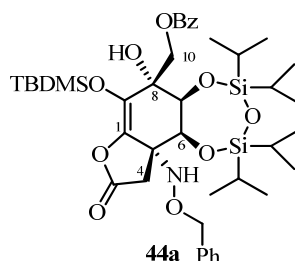
A una disolución de *rac*-(1' R ,1 R_N ,4 S ,5 S ,6 S ,7 S ,8 S)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxí-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) (40 mg, 0.056 mmol) en THF (1 ml) se añadió DABCO (0.045 M en THF, 1.4 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Pasado este tiempo se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna

(hexano/AcOEt, 6:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropil-disiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**43**) (4 mg, rto. 10%) como un aceite transparente.

Reacción *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metiloxi]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**44**) con DABCO cat.

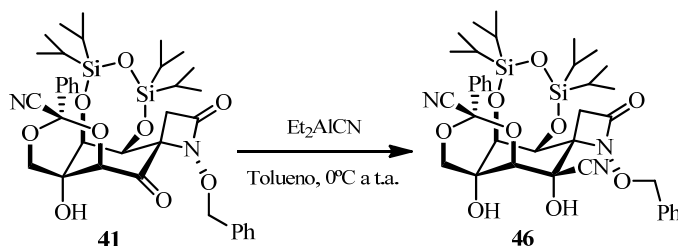


A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metiloxi]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**44**) (11 mg, 0.014 mmol) en THF (0.5 ml) se adicionó a temperatura ambiente DABCO (0.04 M en THF, 0.1 ml, 0.004 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 10:1) obteniéndose *rac*-(5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-5-[(benciloxi)amino]-8-[(benzoiloxi)metil]-9-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-6,7,8-trihidroxi-6,7-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-2-oxabicyclo[4.3.0]non-1(9)-en-3-ona (**44a**) (7 mg, rto. 64%) y *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (*epi*-**44**) (3 mg, rto. 27%).



Calculado: C, 60.48; H, 7.80; N, 1.72.

Síntesis de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-9-ciano-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (46)



A una disolución de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) (90 mg, 0.130 mmol) en tolueno (1 ml) se adicionó a 0°C cianuro de dietilaluminio (1.0 M en tolueno, 0.20 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 14 horas. Se añadió una mezcla de tartrato sódico potásico (10%) - AcOEt ([1:1], 2 ml) y se agitó durante 10 minutos. A continuación, se separan las fases, la fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-9-ciano-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9-pentahidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**46**) (70 mg, rto. 75%).

R_f = 0.25 (TLC, hexano/AcOEt 3:1). Sólido blanco.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.55- 7.33 (10H, m, Ph), 5.18 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 5.01 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.1 Hz, OCH₂Ph), 4.82 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-9), 4.48 (2H, s.ancho, H-8 y H-6), 4.24 (1H, *parte A sist. AB*, J = 12.2 Hz, H-10), 4.09 (1H, *parte B sist. AB*, J = 12.2 Hz, H-10'), 3.23 (1H, *parte*

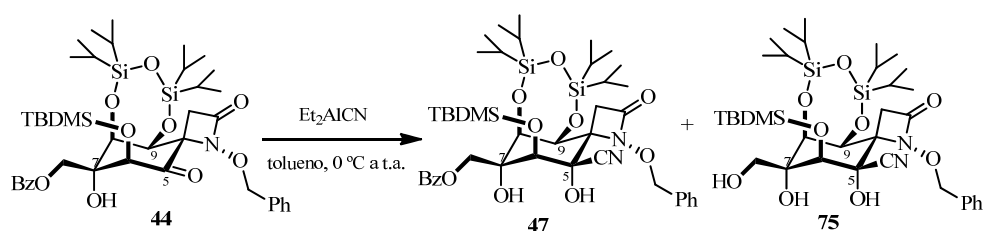
A sist. AB, $J = 14.29$ Hz, H-3), 2.76 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.29$ Hz, H-3') 1.10- 1.00 (28H, m, TIPDS).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 166.1 (C-2), 134.8, 134.7, 130.6, 129.3, 129.2, 129.0, 128.9, 128.7, 128.6, 128.2, 125.4, 125.3, 115.4 (CN-C-1'), 113.9 (CN-C-5), 95.1, 79.2 (OCH_2Ph), 77.5 (C-6), 77.2 (C-8), 77.3 (C-5), 70.2 (C-10), 67.3 (C-4), 65.7 (C-7), 65.1, 38.2 (C-3), 17.7, 17.5, 17.4, 17.2, 17.0, 16.9, 16.8, 16.6, 16.5, 14.0, 13.4, 13.1, 12.9, 1.0.

IR (film): ν 3435.8, 3065, 3034.2, 2959, 2947.2, 2866.0, 2344, 2244, 1760.9, 1624.0, 1453.2, 1261.7, 1105.2, 1008.9, 884.6, 800.7, 696.7.

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 758 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 759 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$)⁺, 737 ($\text{M}+2\text{H}$)⁺, 736 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi) metil]-8-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraiso-propildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (47)



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (44) (92 mg, 0.113 mmol) en tolueno (1 ml) se adicionó a 0 °C cianuro de dietilaluminio (1.0 M en tolueno, 0.17 ml, 0.170 mmol). Después de 24 horas a temperatura ambiente, se añadió una mezcla de tartrato sódico potásico (10%)/AcOEt ([1:1], 4ml), y se agitó durante 5 min. A continuación, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 4 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se

eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-8-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5,6,7,9-tetrahidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**47**) (88 mg, rto. 93%)⁴⁹ como un sólido blanco.

P.f.: 160-162 °C.

R_f = 0.38 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.05 (2H, dm, *J* = 7.9 Hz, Bz), 7.66 (1H, tm, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.51 (2H, ddm, *J* = 7.9, 7.4 Hz, Bz), 7.45-7.40 (2H, m, Ph), 7.37-7.29 (3H, m, Ph), 5.33 (1H, s ancho, HO-C(5)), 5.16 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.8 Hz, OCH₂Ph), 5.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.8 Hz, OCH₂Ph), 4.91 (1H, d, *J* = 4.0 Hz, H-9), 4.75 (1H, s ancho, HO-C(7)), 4.71 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.2 Hz, H-10), 4.67 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.2 Hz, H-10'), 4.52 (1H, dd, *J* = 4.0, 1.1 Hz, H-8), 4.27 (1H, d, *J* = 1.1 Hz, H-6), 3.31 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.7 Hz, H-3), 2.87 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.7 Hz, H-3'), 1.12-1.01 (28H, m, TIPDS), 0.96 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.33 (3H, s, SiCH₃), 0.28 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 168.7, 167.3 (C-2), 135.7, 134.3, 129.9, 128.8, 128.4, 128.3, 118.1 (CN), 79.3 (C-5), 78.5, 77.3 (C-7), 75.4 (C-8), 74.0 (C-6), 67.9 (C-4), 67.8 (C-10), 64.8 (C-9), 38.5 (C-3), 26.5, 18.8, 17.7, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.8, 13.8, 13.05, 13.0, -3.8, -4.2.

IR (film): ν 3333, 2947, 2891, 2866, 2349, 1759, 1727, 1602, 1462, 1453, 1264, 1155, 1113, 1068, 1000, 888, 838, 779 cm⁻¹.

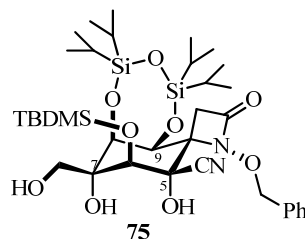
LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1703 (2M+Na)⁺, 863 (M+Na)⁺, 841 (M+H)⁺.

A.E. (C₄₂H₆₄N₂O₁₀Si₃): Hallado: C, 60.12; H, 7.98; N, 3.61.

Calculado: C, 59.97; H, 7.67; N, 3.33.

⁴⁹ En algunas ocasiones, cuando el Et₂AlCN no procedía de un lote comercial recién abierto, fue necesario utilizar 2.0 equiv. de éste para que la reacción se completara, el rendimiento de **47** disminuyó al 83% y se aisló el producto de desprotección del grupo benzoato de C-10, **75** (rto. 10%).

***rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*)-1-Benciloxi-8-[(*terc*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5,6,7,9-tetrahidroxi-7-hidroximetil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (75)**

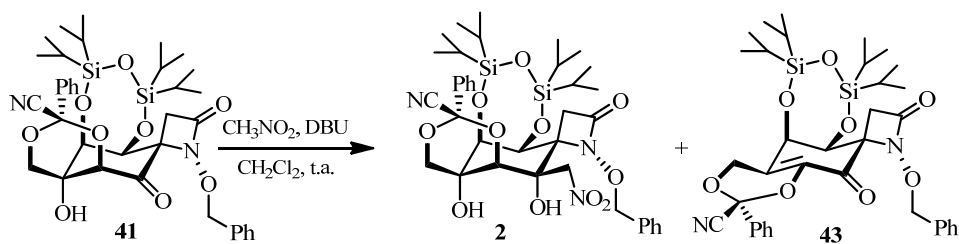


$R_f = 0.16$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.49-7.30 (5H, m, Ph), 5.18 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.0$ Hz, OCH₂Ph), 5.12 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.0$ Hz, OCH₂Ph), 4.86 (1H, s ancho, HO-C(5)), 4.83 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-9), 4.36 (1H, dd, $J = 4.1, 0.9$ Hz, H-8), 4.14 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-6), 4.06 (1H, s ancho, HO-C(7)), 3.98 (1H, dd, $J = 10.2, 5.2$ Hz, H-10), 3.66 (1H, dd, $J = 10.2, 3.5$ Hz, H-10'), 3.30 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3), 2.86 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3'), 2.11 (1H, m, HO-C(10)), 1.15-0.98 (28H, m, TIPDS), 0.93 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.29 (3H, s, SiCH₃), 0.22 (3H, s, SiCH₃).

LRMS (API-ES⁺): m/z 1497 (2M+Na+H)⁺, 759 (M+Na)⁺, 737 (M+H)⁺.

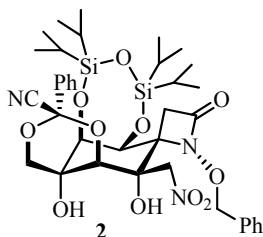
1.2.2. Síntesis del nitroalcohol 2



A una disolución incolora de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-

[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) (130 mg, 0.183 mmol) en CH₂Cl₂ (1.8 ml) se adicionó, secuencialmente y a temperatura ambiente, nitrometano (1.8 ml) y DBU (28 mg, 28 μ l, 0.183 mmol) (disolución naranja). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 horas (disolución marrón). Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 7:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-7-eno-2,9-diona (**43**) (13 mg, rto. 10%) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-11-nitro-7,9-dimetil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (**2**) (65 mg, rto. 46%) como un sólido blanco.

***rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*)-1-(Benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-11-nitro-7,9-dimetil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (**2**)**



P.f. 186-187 °C.

***R*_f** = 0.31 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (dd, *J* = 7.1, 1.5 Hz, Ph), 7.48-7.34 (m, Ph), 5.16 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.9 Hz, OCH₂Ph), 5.12 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.9 Hz, OCH₂Ph), 5.05 (1H, d, *J* = 3.8 Hz, H-5), 4.96 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-11'), 4.69 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, H-11), 4.58 (1H, dd, *J* =

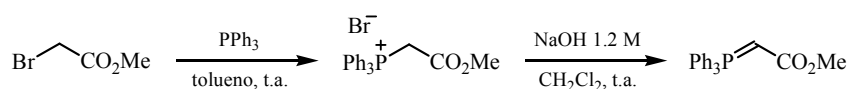
3.8, 1.4 Hz, H-6), 4.55 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8), 4.44 (1H, s, C(9)-OH), 4.28 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10), 4.16 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10'), 4.16 (1H, s, C(7)-OH), 3.23 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 15.2$ Hz, H-3), 2.25 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 15.2$ Hz, H-3'), 1.14-0.98 (22H, m, TIPDS), 0.85 (3H, d, $J = 2.2$ Hz), 0.67 (3H, dd, $J = 4.2, 3.4$ Hz).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 166.4 (C-2), 135.1, 135.0, 130.6, 128.9, 128.8, 128.6, 128.5, 125.5, 113.6 (CN), 95.6 (C-1'), 78.1 (CH_2Ph), 77.2 (C-6), 76.2 (C-9), 75.6 (C-8), 75.4 (C-11), 70.4 (C-10), 68.6 (C-4), 65.9 (C-5), 65.6 (C-7), 36.4 (C-3), 17.7, 17.5, 17.4, 17.1, 16.9, 16.8, 16.76, 16.74, 14.6, 13.2, 13.1, 13.0.

IR (KBr): ν 3429, 3061, 3032, 2946, 2896, 2869, 2215, 1768, 1727, 1561, 1463, 1382, 1261, 1158, 1107, 998, 885, 847, 785, 696 cm^{-1}

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 793 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 771 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, 770 (M)⁺, 744 ($\text{M}-\text{CN}+\text{H}$)⁺, 743 ($\text{M}-\text{CN}$)⁺, 691 ($\text{M}-\text{Ph}$).

Síntesis de [(Metoxycarbonil)metilen]trifenilfosforano⁵⁰



A una disolución de trifenilfosfina (9.62 g, 36.3 mmol) en tolueno (20 ml) se adicionó gota a gota, a temperatura ambiente, una disolución de bromoacetato de metilo (3.38 ml, 34.6 mmol) en tolueno (20 ml). Después de 30 min de agitación a temperatura ambiente, el precipitado blanco formado se filtró a vacío y se lavó con tolueno (3 x 40 ml), obteniendo el bromuro de [(metoxycarbonil)metil]trifenilfosfonio (14.37 g, rto. cuant.), que se utilizó en la siguiente reacción sin purificar.

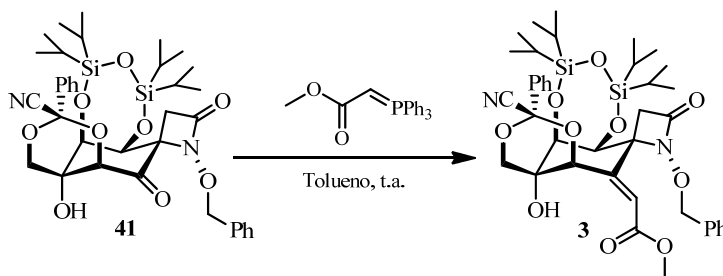
⁵⁰ (a) Werkhoven, T.M.; van Nispen, R.; Lugtenburg, J. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2909-2914.
(b) Villa M-J.; Warren, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1994**, 1569-1572.

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 8.00-7.60 (15H, m, 3 x Ph), 5.62 (1H, d, ²J_{P,H} = 15.5 Hz, PCH₂CO₂Me), 3.61 (3H, s, OCH₃).

A una disolución de la sal de fosfonio anterior disuelta en CH₂Cl₂ (90 ml) se añadió una disolución de NaOH (2.82 g, 69.2 mmol) en agua (60 ml) (NaOH 1.2 M) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 horas. Pasado este tiempo, se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 ml). La combinación de fases orgánicas se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose el [(metoxycarbonil)metilen]trifenilfosforano (11.56 g, rto. cuant.) como un sólido blanco.⁵¹

¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃): δ 7.80-7.40 (15H, m, 3 x Ph), 5.62 (1H, m, PCHCO₂Me), 3.52 (75%) y 2.90 (25%)⁵² (3H, 2 s, OCH₃).

1.2.3. Síntesis de *rac*-(Z,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)



⁵¹ Antes de ser utilizado, el fosforano obtenido se secó en un desecador, conectado a vacío y provisto de pentóxido de fósforo como agente desecante, al menos, durante 24 horas.

⁵² El grupo metoxilo aparece como dos singletes anchos a δ 3.52 y 2.90, en una proporción [3:1] a temperatura ambiente, atribuidos a los dos rotámeros del fosforano.

Una suspensión blanca de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,9-diona (**41**) (190 mg, 0.268 mmol) y [(motoxicarbonil)metilen]trifenilfosforano (359 mg, 1.070 mmol) en tolueno (10 ml) se agitó a temperatura ambiente. A los 15 minutos era una disolución transparente. Pasadas 21 horas se eliminó el disolvente a presión reducida. Sobre el bruto se añadió eter etílico (5 ml) y se sonicó durante 5 minutos. A continuación se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (204 mg, 99%) como un sólido blanco.

P.f: 167-169°C.

R_f = 0.37 (TLC, Hex: AcOEt 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58-7.56 (2H, m, Ph), 7.46-7.35 (8H, m, Ph), 6.56 (1H, s, H-11), 6.25 (1H, d, *J* = 1.4 Hz, H-8), 5.31 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, OCH₂Ph), 5.15 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.0 Hz, OCH₂Ph), 4.68 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-5), 4.48 (1H, dd, *J* = 3.7, 1.4 Hz, H-6), 4.32 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10), 4.21 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10'), 3.77 (3H, s, OCH₃), 3.37 (1H, *part. A sist. AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3'), 2.98 (1H, s.ancho, C(7)-OH), 2.63 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.7 Hz, H-3), 1.13- 1.04 (28H, m, TIPDS).

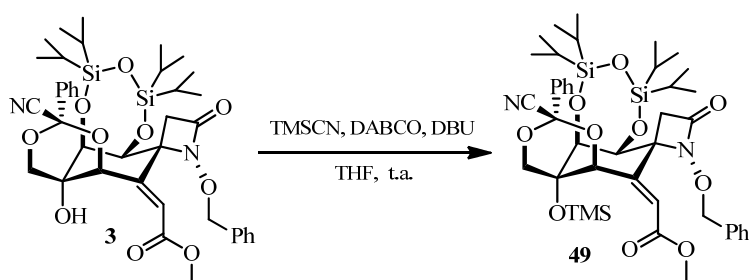
¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 165.9 (COOCH₃), 163.5 (C-2), 147.2 (C-9), 135.6, 134.7, 130.3, 129.3, 128.90, 128.86, 128.81, 128.5, 128.3, 127.0, 125.6, 123.9 (C-11), 114.6 (CN), 95.1 (C-1'), 78.6 (OCH₂Ph), 77.2 (C-7), 76.4 (C-6), 73.3 (C-8), 71.4 (C-10), 69.9, 69.7 (C-5), 65.6 (C-4), 52.6 (COOCH₃), 52.2, 41.6 (C-3), 17.8, 17.55, 17.49, 17.2, 17.1, 17.0, 16.74, 16.69, 16.56, 14.2, 13.2, 13.1, 13.0, 12.9.

IR (KBr): ν 3400, 3061, 3032, 2948, 2890, 2868, 2247, 1752, 1726, 1658, 1463, 1387, 1275, 1261, 1153, 1096, 1000, 886, 798, 756, 695 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1552 ($2\text{M}+\text{H}+\text{Na}$)⁺, 761 ($\text{M}+\text{Na}-\text{CN}$)⁺, 740 ($\text{M}+2\text{Na}+\text{H}$)⁺, 739 ($\text{M}+\text{H}-\text{CN}$)⁺, 738 ($\text{M}-\text{CN}$)⁺.

1.2.3.1. Protección del hidroxilo terciario de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)

Método A



A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (102 mg, 0.133 mmol) en THF (1 ml) se adicionó, secuencialmente, a temperatura ambiente una disolución de cinuro de trimetilsililo (54 mg, 72 μl , 0.910 mmol) en THF (1.5 ml) y DBU (6 mg, 6 μl , 0.040 mmol)⁵³. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante cuatro horas. Pasado este tiempo se eliminó el disolvente a presión reducida, se añadió eter etílico (5 ml) y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna

⁵³ Se usó inicialmente DABCO como base pero como la reacción no procedía se añadió una base más fuerte (DBU) y la reacción tubo lugar.

(hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-fenil(metoxi)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-9-[2-metoxi-2-oxoetiliden]-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-7-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**49**) (35 mg, rto. 32%) como un sólido blanco y se recuperó *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1, 3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (57 mg, rto. 56%).

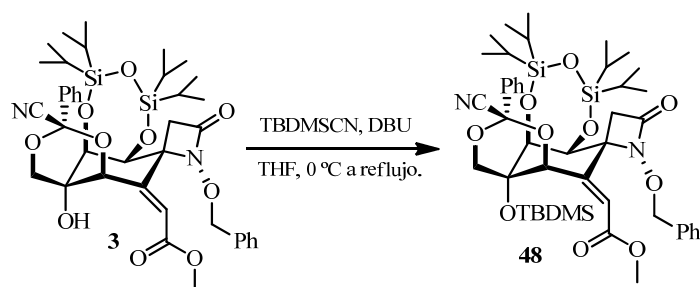
R_f = 0.47 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (dd, J = 8.0, 1.3 Hz, Ph), 7.40-7.27 (m, Ph), 6.53 (1H, s, H-11), 6.15 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-8), 5.28 (1H, *parte A sist. AB*, J = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 5.12 (1H, *parte B sist. AB*, J = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 4.67 (1H, d, J = 3.7 Hz, H-5), 4.40 (1H, dd, J = 3.7, 1.5 Hz, H-6), 4.34 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.5 Hz, H-10), 4.26 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.5 Hz, H-10'), 3.79 (3H, s, COO-CH₃), 3.34 (1H, *parte A sist. AB*, J = 13.5 Hz, H-3), 2.54 (1H, *parte B sist. AB*, J = 13.5 Hz, H-3'), 1.11-1.04 (m), 0.82 (s), 0.60 (d, J = 2.5 Hz), 0.23 (s).

¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃): δ 165.2 (COOCH₃), 163.6 (C-2), 146.9 (C-9), 135.9, 135.6, 130.2, 128.7, 128.5, 125.6, 124.0 (C-11), 114.8 (CN), 95.0 (C-1'), 78.6 (CH₂Ph), 78.0 (C-6), 73.2 (C-8), 70.6 (C-10), 69.5 (C-4), 69.3 (C-5), 68.6 (C-7), 52.1 (COOCH₃), 42.4 (C-3), 17.8, 17.5, 17.1, 17.0, 16.7, 16.5, 14.2, 13.3, 13.1, 2.4.

IR (film): ν 3061, 3032, 2949, 2890, 2869, 2224, 1781, 1728, 1659, 1461, 1454, 1386, 1338, 1255, 1134, 1008, 942, 884, 844, 797, 756, 695 cm⁻¹

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1696 (2M+Na+H)⁺, 859 (M+Na)⁺, 813 (M-CN+3H)⁺, 811 (M-CN+H), 810 (M-CN).

Método B

A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (87 mg, 0.114 mmol) en THF (1.5 ml) se adicionó, secuencialmente, a 0 °C una disolución de cinuro de *tert*-butildimetilsililo (132 mg, 0.910 mmol) en THF (1 ml) y DBU (19 mg, 19 µl, 0.125 mmol). A continuación la reacción se calentó a reflujo de THF durante 14 horas. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 9:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-[8,10-*O*-fenil(metoxi)metilen]-5,6,8,10-tetrahidroxi-7-metil-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**48**) (70 mg, rto. 70%) como un sólido blanco.

¹H-RMN δ (400 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (dd, *J* = 3.1, 1.3 Hz, Ph), 7.55-7.33 (m, Ph), 6.55 (1H, s, H-11), 6.19 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-8), 5.26 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, OCH₂Ph), 5.12 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, OCH₂Ph), 4.76 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, H-5), 4.41 (1H, dd, *J* = 3.7, 1.5 Hz, H-6), 4.37 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10), 4.26 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.6 Hz, H-10'), 3.78 (3H, s, COO-CH₃), 3.35 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.6 Hz, H-3), 2.56 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.6 Hz, H-3'), 1.11-1.00 (m), 0.84 (s), 0.29 (s), 0.20 (s).

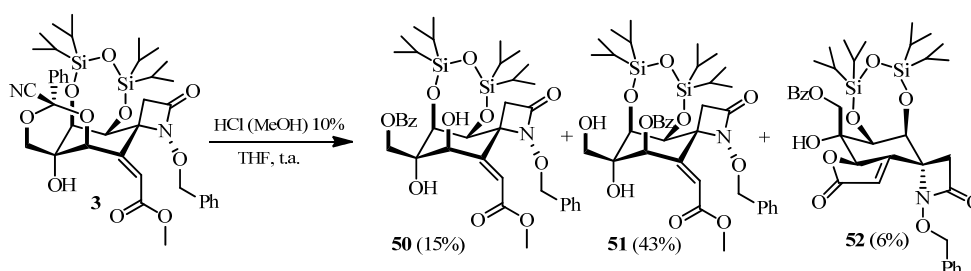
^{13}C -RMN (125 MHz, CDCl_3): δ 165.4 (COOCH_3), 163.9 (C-2), 147.2 (C-9), 135.8, 134.8, 130.5, 129.1, 129.0, 128.7, 128.5, 125.8, 124.3 (C-11), 115.1 (CN), 95.2 (C-1'), 78.8 (CH_2Ph), 78.2 (C-6), 73.3 (C-8), 70.8 (C-10), 69.6 (C-4), 69.5 (C-5), 68.7 (C-7), 52.3 (COOCH_3), 42.6 (C-3), 25.9, 18.3, 18.0, 17.7, 17.6, 17.4, 17.3, 17.0, 16.7, 14.7, 13.5, 13.2, -1.5, -2.1.

IR (film): ν 3067, 3035, 2950, 2894, 2868, 2253, 1779, 1728, 1659, 1496, 1463, 1436, 1388, 13698, 1339, 1276, 1256, 1226, 1155, 1132, 1112, 1050, 1031, 1001, 910, 885, 838, 827, 797, 780, 734, 695, 660, 648 cm^{-1}

LRMS (API- ES^+): m/z 904 ($\text{M}+\text{Na}+4\text{H}$) $^+$, 901 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$) $^+$, 881 ($\text{M}+4\text{H}$) $^+$, 880 ($\text{M}+3\text{H}$) $^+$, 879 ($\text{M}+2\text{H}$) $^+$, 853 ($\text{M}-\text{CN}+2\text{H}$) $^+$, 852 ($\text{M}-\text{CN}+\text{H}$) $^+$.

1.2.3.2. Hidrólisis de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-penta-hidroxi-9-(2-metoxi-2-oxo-etiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)

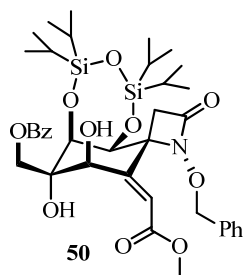
Método A



A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (79 mg, 0.103 mmol) en THF (0.9 ml) se adicionó HCl (10% en MeOH, 0.39 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante un día. Pasado este

tiempo, se añadió, secuencialmente, una disolución tampón Na_2HPO_4 (0.1 M, 2 ml) y una disolución NaHCO_3 (10% acuosa, 1 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 2:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8-tetrahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**) (15 mg, rto. 15%), *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**51**) como un sólido blanco (33 mg, rto. 43%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-9-metiliden-2-oxo-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-11,8-carbolactona (**52**) (5 mg, 6%) como un sólido blanco.

***rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8-tetrahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**)**



P.f : 186-187 °C.

R_f = 0.39 (TLC, Hex: AcOEt 2:1).

¹H- RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 8.11 (2H, d, J = 10.4 Hz, Bz), 7.61-7.59 (1H, m, Bz), 7.51-7.46 (2H, m, Bz), 7.39- 7.34 (5H, m, Ph), 6.37 (1H, s, H-11), 5.75 (1H,

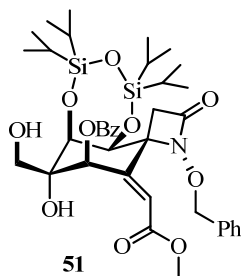
d, $J = 10.4$ Hz, H-8), 5.32 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.2$ Hz, OCH_2Ph), 5.13 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.2$ Hz, OCH_2Ph), 4.91 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, H-10), 4.89 (1H, d, $J = 3.6$ Hz, H-5), 4.66 (1H, m, H-6), 4.58 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.5$ Hz, H-10'), 4.03 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, C(8)-OH), 3.73 (3H, s, OCH_3), 3.36 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.2$ Hz, H-3), 3.06 (1H, s, C(7)-OH), 2.83 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.2$ Hz, H-3'), 1.13- 1.04 (28H, m, TIPDS).

^{13}C - RMN (100 MHz, CDCl_3) δ 167.1 (COOCH_3), 167.0 (CH_2OCOPh), 164.1 (C-2), 153.0 (C-9), 135.0, 133.7, 130.0, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 120.4 (C-11), 78.7 (CH_2Ph), 76.0 (C-6), 73.4 (C-7), 70.3 (C-4), 70.1 (C-5), 69.3 (C-8), 66.8 (C-10), 52.0 (COOCH_3), 42.4 (C-3), 17.7, 17.6, 17.4, 17.3, 17.27, 17.23, 14.4, 13.9, 13.4, 13.3.

IR (film): ν 3420, 2943, 2867, 1755, 1725, 1452, 1432, 1270, 1147, 1113, 999, 882, 791, 694 cm^{-1} .

LRMS (API-ES $^+$): m/z 779 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$) $^+$, 778 ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 759 ($\text{M}+4\text{H}$) $^+$, 758 ($\text{M}+3\text{H}$) $^+$, 757 ($\text{M}+2\text{H}$) $^+$, 756 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

***rac*-(Z,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(Benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (51)**



P.f.: 155-158 $^{\circ}\text{C}$.

$R_f = 0.27$ (TLC, Hex: AcOEt 2:1).

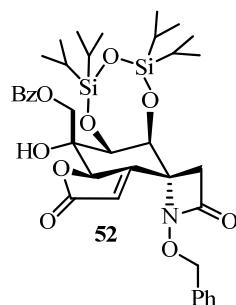
¹H- RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.00 (2H, m, Bz), 7.60-7.37 (8H, m, Ph y Bz), 7.06 (1H, s, H-8), 6.48 (1H, s, H-11), 5.33 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 9.6$ Hz, OCH₂Ph), 5.18 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 9.6$ Hz, OCH₂Ph), 4.81 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-5), 4.41 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-6), 3.91 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 7.7$ Hz, H-10'), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.62 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.0$ Hz, H-3'), 3.44 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 7.7$ Hz, H-10), 3.28 (1H, s, C(7)-OH), 2.81 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.0$ Hz, H-3), 1.13- 1.04 (28H, m, TIPDS).

¹³C- RMN (75MHz, CDCl₃) δ 167.1 (CH₂OCOPh), 165.8 (COOCH₃), 163.8 (C-2), 148.5 (C-9), 134.7, 133.9, 130.1, 129.8, 128.8, 128.7, 128.6, 128.5, 122.3 (C-3), 78.5 (CH₂Ph), 75.2 (C-6), 74.5 (C-8), 70.4 (C-5), 69.8 (C-7), 67.7 (C-4), 64.1 (C-10), 51.9 (COOCH₃), 42.3 (C-3), 29.6, 17.8, 17.5, 17.4, 17.2, 17.1, 17.0, 14.3, 13.6, 13.0, 12.9.

IR (film): ν 3433, 2949, 2867, 1776, 1727, 1658, 1597, 1453, 1435, 1269, 1164, 1111, 1026, 1002, 947, 882, 808, 694 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 796 (M+Na+H₂O)⁺, 779 (M+Na+H)⁺, 778 (M+Na)⁺, 775 (M+2H+H₂O)⁺, 774 (M+H+H₂O)⁺, 759 (M+4H)⁺, 758 (M+3H)⁺, 757 (M+2H)⁺, 756 (M+H)⁺.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(Benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-9-metiliden-2-oxo-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-11,8-carbolactona (52)**



P.f.: 175-178 °C.

R_f = 0.37 (TLC, Hex: AcOEt 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.03 (2H, d, *J* = 7.1 Hz, Bz), 7.62 (1H, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.48 (2H, t, *J* = 7.4 Hz, Bz), 7.37 (5H, m, Ph), 6.03 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-11), 5.18 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.8 Hz, OCH₂Ph), 5.06 (1H, d, *J* = 1.7 Hz, H-8), 5.02 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.8 Hz, OCH₂Ph), 4.99 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.2 Hz, H-10), 4.74 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-5), 4.63 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-6), 4.47 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.2 Hz, H-10'), 3.40 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.3 Hz, H-3), 3.05 (1H, s, C(7)-OH), 2.55 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.2 Hz, H-3'), 1.14-0.97 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75MHz, CDCl₃) δ 172.0 (COOC(8)), 167.7 (CH₂OCOPh), 164.5 (C-9), 163.6 (C-2), 135.0, 134.0, 129.9, 129.2, 128.9, 128.6, 121.7, 79.4 (C-8), 77.4, 75.9 (C-7), 72.9 (C-6), 70.3 (C-5), 66.8 (C-10), 65.9 (C-4), 41.4 (C-3), 17.8, 17.7, 17.5, 17.34, 17.29, 17.22, 17.1, 14.4, 14.2, 13.5, 13.4.

IR (film): ν 3412, 3061, 3026, 2948, 2890, 2868, 1785, 1760, 1726, 1655, 1602, 1464, 1452, 1367, 1272, 1113, 1007, 885, 755, 709 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): *m/z* 780 (M+Na+MeOH+3H)⁺, 779 (M+Na+MeOH+2H)⁺, 778 (M+Na+MeOH+H)⁺.

LRMS (API-ES): *m/z* 777 (M+Na+MeOH)⁺, 754 (M+MeOH)⁺, 740 (M+H₂O)⁺.

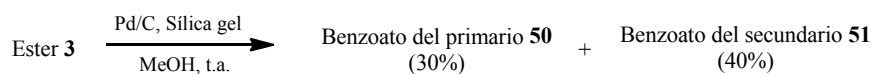
Método B



A una disolución de *rac*-(Z,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxí-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (21 mg, 0.027 mmol) en CH₂Cl₂ (2 ml) se adicionó, a 0°C, triflato de

trimetilsililo (15 μ l, 0.200 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante tres días. Pasado este tiempo, se añadió, a 0°C, una disolución tampón Na_2HPO_4 (0.1 M, 2 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 3 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**) (1 mg, rto. 4%), *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-8-(benzoilo-xi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetrai-sopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**51**) como un sólido blanco (7 mg, rto. 34%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7-trihidroxi-9-metiliden-2-oxo-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopro-pildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-11,8-carbolactona (**52**) (10 mg, 50%) como un sólido blanco.

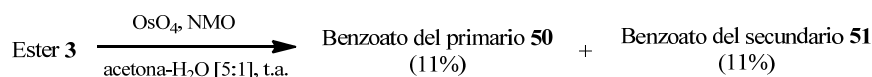
Método C



A una disolución *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (57 mg, 0.075 mmol) en MeOH (1 ml) se añadió paladio sobre carbono (10 %, 2 mg, 0.002 mmol). La suspensión negra resultante se agitó a temperatura ambiente durante 21 horas. Pasado este tiempo, se añadió paladio sobre carbono (10 %, 2 mg, 0.002 mmol) y la mezcla se agitó durante 25 horas. Pasado este tiempo, se añadió sílica gel (25 mg) y metanol (1 ml) y la suspensión se agitó a temperatura

ambiente durante 24 horas. Se añadió de nuevo sílica gel (25 mg) y metanol (1 ml) y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. La suspensión se filtró, a vacío a través de *Celita*[®]. Se lavó con AcOEt (5 ml) y MeOH (5 ml). Se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**) (6 mg, rto. 30%) y *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-9-[2-metoxi-2-oxoetiliden]-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**51**) (8 mg, rto. 40%).

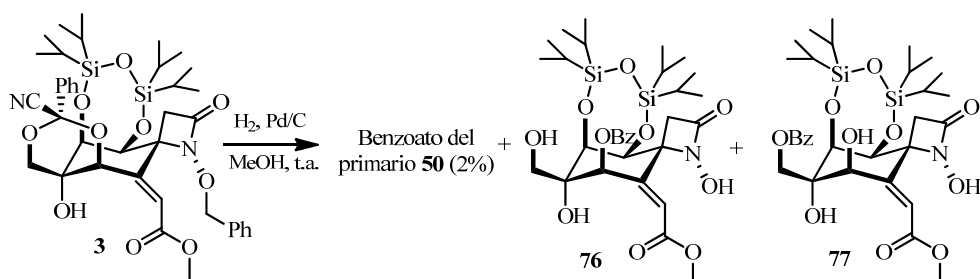
Método D



A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (57 mg, 0.075 mmol) en acetona (1 ml) se añadió, secuencialmente y a temperatura ambiente, H₂O (0.2 ml, milli Q), 4-óxido de 4-metil-morfolina (20 mg, 0.164 mmol) y tetroxido de osmio (2.5 % en peso en *t*-BuOH, 56 µl, 4.47·10⁻³ mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente. Después de 1, 7, y 9 días se añadió tres veces, 4-óxido de 4-metilmorfolina (20 mg, 0.164 mmol) y tetroxido de osmio (2.5 % en peso en *t*-BuOH, 0.22 ml, 0.018 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante tres días. Pasado este tiempo, se añadió una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ (10%, 1 ml) y se agitó durante 15 minutos. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 3 ml).

La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano-AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**) (6 mg, rto. 11%) y *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-8-(benzoiloxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**51**) (6 mg, rto. 11%).

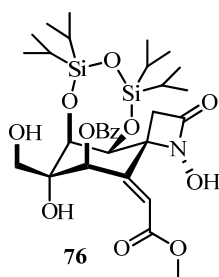
Hidrogenación de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3**)**



A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**3**) (45 mg, 0.059 mmol) en MeOH (1 ml) se añadió paladio sobre carbono (10 %, 4 mg, 0.004 mmol) bajo atmósfera de hidrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas. Pasado este tiempo, se añadió, de nuevo, paladio sobre carbono (10 %, 4 mg, 0.004 mmol) bajo atmósfera de hidrógeno. Después de 1.5 horas la mezcla se filtró a través de Celita[®] con AcOEt (5 ml) y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía

en columna (hexano/AcOEt, 3:1) obteniéndose *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-7-[(benzoiloxi)metil]-5,6,7,8-tetrahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**50**) (2 mg, rto. 2%), *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-8-(benzoiloxi)-1,5,6,7-tetrahidroxi-7-(hidroxi-metil)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**76**) (23 mg, rto. 49%) como un solido blanco y *rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-7-[(benzoiloxi)metil]-1,5,6,7,8-pentahidroxi-9-[(*Z*)-2-me-toxi-2-oxoetiliden]-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (**77**) (18 mg, rto. 40%).

***rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-8-(Benzoiloxi)-1,5,6,7-tetrahidroxi-7-(hidroxime-til)-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**76**)**



P.f.: 138- 141°C.

***R*_f** = 0.54 (TLC, Hex: AcOEt 1:1).

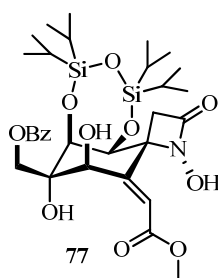
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.59-7.56 (2H, m, Ph), 7.41-7.33 (3H, m, Ph), 6.61 (1H, s, H-11), 6.19 (1H, s, H-8), 4.61 (1H, d, *J* = 3.9 Hz, H-5), 4.48 (1H, dd, *J* = 3.9, 1.1 Hz, H-6), 4.34 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10), 4.17 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 12.0 Hz, H-10'), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.39 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.0 Hz, H-3), 2.94 (2H, s. ancho, N-OH y C(7)-OH), 2.62 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.0 Hz, H-3'), 1.12- 0.99 (19H, m, TIPDS), 0.83 (6H, s. ancho, C(CH₃)₂, TIPDS), 0.63 (3H, s, CH₃).

^{13}C -RMN (75MHz, CDCl_3) δ 167.1, 166.3, 146.6, 135.6, 130.3, 128.6, 128.3, 125.6, 123.3, 114.6, 95.4, 77.2, 76.5, 73.9, 71.4, 69.3, 68.5, 65.9, 52.7, 41.0, 17.7, 17.5, 17.4, 17.1, 17.0, 16.8, 16.6, 14.0, 13.2, 13.1, 12.8.

IR (KBr): ν 3386, 2946, 2846, 2100, 1760, 1726, 1452, 1435, 1276, 1152, 1108, 1094, 997, 882, 800, 691 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 1345 ($2\text{M}+\text{Na-CN}$)⁺, 676 ($\text{M}+2\text{H}$), 675 ($\text{M}+\text{H}$), 651 ($\text{M}+3\text{H-CN}$), 650 ($\text{M}+2\text{H-CN}$), 649 ($\text{M}+\text{H-CN}$), 648 (M-CN).

***rac*-(*Z*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-7-[(Benzoiloxi)metil]-1,5,6,7,8-pentahidroxi-9-[(*Z*)-2-metoxi-2-oxoetiliden]-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (77)**



R_f = 0.41 (TLC, Hex: AcOEt 1:1).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 8.12 (2H, d, J = 7.11 Hz, Bz), 7.51-7.40 (3H, m, Bz), 6.39 (1H, s, H-11), 5.74 (1H, d, J = 9.7 Hz, H-8), 4.90 (1H, *parte A sist. AB*, J = 11.5 Hz, H-10), 4.79 (1H, d, J = 3.6 Hz, H-5), 4.54 (1H, dd, J = 3.6, 1.6 Hz, H-6), 4.54 (1H, *parte B sist. AB*, J = 11.5 Hz, H-10'), 3.97 (1H, d, J = 9.7 Hz, C(8)-OH), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.36 (1H, *parte A sist. AB*, J = 13.2 Hz, H-3), 3.14 (1H, s, C(7)-OH), 2.84 (1H, *parte B sist. AB*, J = 13.2 Hz, H-3'), 1.13- 1.00 (28H, m, TIPDS).

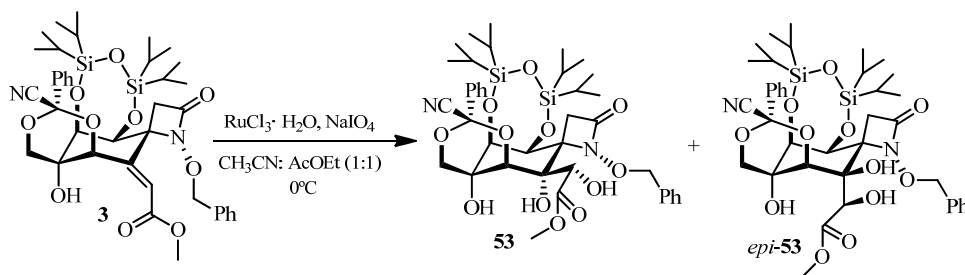
^{13}C -RMN (100MHz, CDCl_3) δ 167.1, 166.9, 166.7, 152.4, 133.5, 130.1, 129.8, 129.4, 129.7, 128.5, 119.4, 77.2, 75.7, 73.3 (C-7), 69.5, 69.1, 69.0 (C-4), 66.6 (C-

10), 52.0 (COOCH₃), 41.6 (C-3), 17.5, 17.4, 17.3, 17.1, 17.03, 17.00, 16.9, 14.0, 13.7, 13.2, 12.9.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 13 (2M+Na)⁺, 689 (M+Na+H)⁺, 688 (M+Na)⁺, 648 (M+H-H₂O)⁺, 634 (M-MeOH)⁺.

1.2.4. Síntesis de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxicarbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (4)

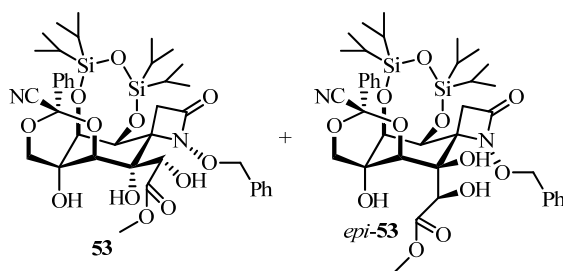
1.2.4.1. Dihidroxilación de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)



A una disolución de *rac*-(*Z*,1'*R*,1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,10-pentahidroxi-9-(2-metoxi-2-oxoetiliden)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3) (95 mg, 0.124 mmol) en AcOEt/CH₃CN ([1:1], 2ml) se añadió una disolución de tricloruro de rutenio hidratado (7 mg, 0.033 mmol) y periodato sódico (40 mg, 0.186 mmol) en agua (0.45 ml) a 0°C y con agitación vigorosa. Se agitó a 0°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, a la mezcla de reacción se añadió una disolución saturada de Na₂S₂O₃ (0.6 ml) y AcOEt (1 ml). Se separaron

las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (4 x 3ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1) obteniéndose una mezcla 2:1 de *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (**53**) y *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*,11*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-**53**) (34 mg, rto. 34%).

Mezcla 2:1 de *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (53**) y *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*,11*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-**53**)**



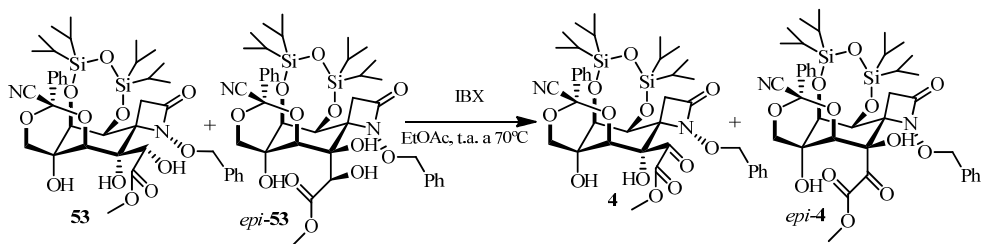
$R_f = 0.32$ (TLC, Hex: AcOEt 2:1).

¹H- RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.58 (4H, m, Ph), 7.39-7.36 (16H, m, Ph), 5.49 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 9.3$ Hz, OCH₂Ph, (*epi*-**53**)), 5.29 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 9.3$ Hz, OCH₂Ph, (*epi*-**53**)), 5.18 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.3$ Hz, OCH₂Ph, (**53**)),

5.09 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-5, (**53**)), 5.08 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.3$ Hz, OCH_2Ph , (**53**)), 4.97 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-11, (*epi*-**53**)), 4.95 (1H, s, OH-9, (*epi*-**53**)), 4.85 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-5 (*epi*-**53**)), 4.80 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-11, (**53**)), 4.70 (1H, s, OH-9 (**53**)), 4.60 (1H, dd, $J = 3.9, 1.4$ Hz, H-8, (**53**)), 4.60 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, OH-11, (*epi*-**53**)), 4.45 (1H, s. ancho, H-8, (*epi*-**53**)), 4.32 (1H, s. ancho, H-6, (*epi*-**53**)), 4.32 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8, (**53**)), 4.30 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.0$ Hz, H-10, (**53**)), 4.24 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10, (*epi*-**53**)), 4.20 (1H, s, OH-7, (**53**)), 4.12 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.0$ Hz, H-10', (**53**)), 4.05 (1H, s, OH-7, (*epi*-**53**)), 3.96 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10', (*epi*-**53**)), 3.91 (1H, s, OCH_3 , (*epi*-**53**)), 3.70 (1H, d, OH-11, $J = 5.5$ Hz, (**53**)), 3.70 (1H, s, OCH_3 , (**53**)), 3.20 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3', (**53**)), 3.18 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3', (*epi*-**53**)), 3.11 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3, (*epi*-**53**)), 2.80 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3, (**53**)), 1.13- 1.03 (38H, m, TIPDS), 0.84 (6H, s. ancho, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, TIPDS, (**53**)), 0.76 (6H, d, $J = 1.9$ Hz, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$, TIPDS, (*epi*-**53**)), 0.67- 0.64 (3H, m, CH_3 , (**53**)), 0.52 (3H, t, $J = 3.4$ Hz, CH_3 , (*epi*-**53**)).

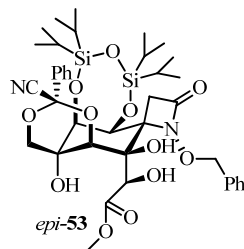
LRMS (*API-ES*⁺): m/z 758 ($2\text{M}+\text{Na}+\text{H}$)⁺, 822 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$)⁺, 821 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 802 ($\text{M}+4\text{H}$)⁺, 801 ($\text{M}+3\text{H}$)⁺, 800 ($\text{M}+2\text{H}$)⁺, 799 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

1.2.4.2. Síntesis de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxi-carbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro [3.5]nonan-2-ona (4)



A una disolución de una mezcla 1:1 *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R_N*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*S*,11*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (**53**) y *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R_N*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*,11*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-**53**) (28 mg, 0.035 mmol) en AcOEt (1.5 ml) se adicionó, a temperatura ambiente, IBX (30 mg) y se formó una suspensión blanca que se calentó a 70°C durante 160 minutos. Pasado este tiempo, la suspensión se filtró a vacío, a través de Celita[®], en placa filtrante n°3. De la disolución resultante se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R_N*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*,11*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-**53**) (6 mg, rto. 30%) y una mezcla 2:1 *rac*-(1'*R*,1*R_N*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxi-carbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2ona (**4**) y *rac*-(1'*R*,1*R_N*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxicarbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-**4**) (9 mg, rto. 45%).

***rac*-(1'*R*,1''*S*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*R*,9*R*,11*R*)-1-(Benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil) metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-9-(1-hidroxi-2-metoxi-2-oxoetil)-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2ona (*epi*-53)**



$R_f = 0.32$ (TLC, Hex: AcOEt 2:1).

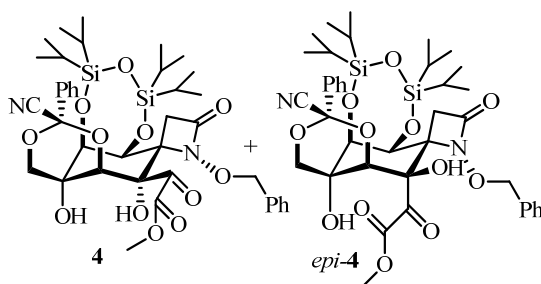
¹H- RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.58 (2H, m, Ph), 7.39-7.36 (8H, m, Ph), 5.49 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 9.3$ Hz, OCH₂Ph), 5.29 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 9.3$ Hz, OCH₂Ph), 4.97 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, H-11), 4.95 (1H, s, OH-9), 4.85 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-5), 4.60 (1H, d, $J = 4.3$ Hz, OH-11), 4.45 (1H, s.ancho, H-6), 4.32 (1H, s.ancho, H-8), 4.24 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10), 4.05 (1H, s, OH-7), 3.96 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10'), 3.91 (1H, s, OCH₃), 3.18 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3), 3.11 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.5$ Hz, H-3'), 1.13- 1.04 (19H, m, TIPDS), 0.76 (6H, d, $J = 1.9$ Hz, C(CH₃)₂, TIPDS), 0.52 (3H, t, $J = 3.4$ Hz, CH₃).

¹³C- RMN (75MHz, CDCl₃): δ 173.1, 163.7, 135.6, 133.3, 130.2, 129.5, 129.1, 128.9, 128.4, 125.6, 114.3, 95.1, 79.3, 79.0, 77.2, 76.8, 73.0, 72.8, 71.5, 67.6, 64.7, 54.2, 36.8, 17.8, 17.7, 17.6, 17.1, 17.0, 16.7, 17.1, 17.0, 16.7, 16.6, 16.4, 14.1, 13.3, 13.0, 12.8.

IR (KBr): ν 3380, 3061, 3032, 2947, 2890, 2867, 2250, 1747, 1461, 1454, 1385, 1276, 1152, 1102, 1055, 1000, 917, 885, 788, 738, 694 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 822 (M+Na+H)⁺, 821 (M+Na)⁺, 802 (M+4H)⁺, 801 (M+3H)⁺, 800 (M+2H)⁺, 799 (M+H)⁺, 772 (M-CN)⁺.

Mezcla 2:1 de *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*S*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano (fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxycarbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (4) y *rac*-(1'*R*,1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-[8,10-*O*-ciano(fenil)metilen]-5,6,7,8,9,10-hexahidroxi-7-metil-9-(metoxycarbonil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (*epi*-4)



$R_f = 0.32$ (TLC, Hex: AcOEt 2:1).

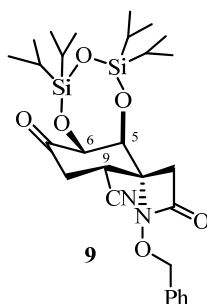
¹H- RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.61-7.58 (4H, m, Ph), 7.52-7.49 (4H, m, Ph), 7.45-7.32 (12H, m, Ph), 5.54 (1H, d, $J = 3.8$ Hz, H-5, (*epi*-4)), 5.20 (1H, s. ancho, OH-7, (*epi*-4)), 5.14 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, OCH₂Ph, (4)), 5.06 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, OCH₂Ph, (4)), 5.02 (1H, d, $J = 3.7$ Hz, H-5, (4)), 4.91 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.2$ Hz, OCH₂Ph, (*epi*-4)), 4.85 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-8, (4)), 4.84 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 10.2$ Hz, OCH₂Ph, (*epi*-4)), 4.72 (1H, s. ancho, OH-7, (4)), 4.62 (1H, s. ancho, H-8, (*epi*-4)), 4.55 (1H, dd, $J = 3.8, 1.4$ Hz, H-6, (4)), 4.43 (1H, dd, $J = 3.7, 1.0$ Hz, H-6, (*epi*-4)), 4.27 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.3$ Hz, H-10, (4)), 4.26 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10, (*epi*-4)), 4.16 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.1$ Hz, H-10', (4)), 4.03 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 12.3$ Hz, H-10', (*epi*-4)), 3.86 (3H, s, OCH₃, (4)), 3.73 (3H, s, OCH₃, (*epi*-4)), 3.27 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.4$ Hz, H-3, (4)), 3.39 (1H, s. ancho, OH-9, (*epi*-4)), 3.18 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.4$ Hz, H-3', (4)), 3.10 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.1$ Hz, H-3, (*epi*-4)), 2.90 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.1$ Hz, H-3', (*epi*-4)), 1.09- 0.98

(38H, m, TIPDS), 0.85-0.82 (12H, d, s. ancho, C(CH₃)₂, TIPDS), 0.72 (6H, m, CH₃).

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1615 (2M+Na)⁺, 820 (M+Na+H)⁺, 819 (M+Na)⁺, 798 (M+2H)⁺, 797 (M+H)⁺.

las suspensiones resultantes a vacío. Finalmente, se desechó el sólido de aspecto gomoso y se evaporó a presión reducida el disolvente de la combinación de las fases orgánicas (filtrados). El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**9**) (284 mg, rto. 67%)⁵⁵, *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-(benciloxi)-7-ciano-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**54**) (66 mg, rto. 15%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-7,9-diciano-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**55**), como sólidos blancos.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-Benciloxi-9-ciano-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**9**)**



P.f.: 132-134 °C.

***R*_f** = 0.58 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).⁵⁶

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):⁵⁷ δ 7.42 (5H, m, Ph), 5.30 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.5 Hz, OCH₂Ph), 5.19 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.5 Hz, OCH₂Ph), 4.99 (1H, d,

⁵⁵ De todos los procedimientos ensayados para aislar la β-cianocetona **9**, éste es el que mejores resultados ofrece. De los 284 mg obtenidos de **9** (rto. 67%), 194 mg proceden de las fases de MeOH (rto. 45%) y los 90 mg restantes derivan de la fase de 1,4-dioxano (rto. 21%).

⁵⁶ Cuando se revela la placa de TLC con una disolución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina en EtOH, la ciano-β-lactama **9** presenta un color verde-azulado.

$J = 2.7$ Hz, H-6), 4.41 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, H-5), 3.68 (1H, dd, $J = 12.4, 5.4$ Hz, H-9), 2.97 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.3$ Hz, H-3'), 2.86 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.3$ Hz, H-3), 2.74 (1H, dd, $J = 14.3, 5.4$ Hz, H-8), 2.60 (1H, dd, $J = 14.3, 12.4$ Hz, H-8'), 1.14-0.88 (28H, m, TIPDS).

$^{13}\text{C-RMN}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 200.0 (C-7), 162.6, 133.7, 129.7, 129.6, 129.2, 128.9, 116.7 (CN), 80.6, 79.7 (C-6), 79.2 (C-5), 67.2 (C-4), 42.4 (C-3), 38.6 (C-8), 31.9 (C-9), 17.5, 17.4, 17.3, 17.1, 17.05, 17.0, 16.9, 14.5, 13.6, 13.0, 12.2.

IR (KBr): ν 3436, 2947, 2867, 2250, 1784, 1748, 1631, 1463, 1389, 1258, 1189, 1093, 1068, 1051, 1018, 883, 799, 697 cm^{-1} .

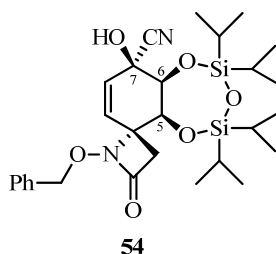
LRMS (*API-ES*⁺): m/z 590 ($\text{M}+32$)⁺, 581 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 559 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

LRMS (*EI*): m/z 558 (M^+ , 1), 515 (5), 473, (1), 436 (1), 409 (1), 394 (1), 379 (1), 366 (2), 353 (1), 339 (4), 175 (2), 163 (2), 147 (4), 135 (6), 119 (5), 105 (4), 91 (100), 77 (3).

A.E. ($\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}_2$): Hallado: C, 60.38; H, 7.29; N, 5.09.

Calculado: C, 60.18; H, 7.58; N, 5.01.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-(Benciloxi)-7-ciano-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (54)**



P.f.: 102-104 °C.

R_f = 0.38 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

⁵⁷ Para facilitar la discusión de los resultados, de las dos señales atribuibles a los protones del metileno C-3, δ 2.97 y 2.86, se asigna a H-3' (*pro-R*^{*}) la que aparece más desapantallada.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.36 (5H, m, Ph), 5.68 (1H, dd, *J* = 9.8, 1.0 Hz, H-8), 5.62 (1H, d, *J* = 9.8 Hz, H-9), 4.96 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.90 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.49 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H-5), 4.47 (1H, dd, *J* = 2.5, 1.0 Hz, H-6), 3.18 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3), 3.04 (1H, s ancho, OH), 2.43 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3'), 1.18-0.80 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.9, 135.5, 133.3, 129.3, 129.0, 128.6, 126.3, 119.1, 79.0, 75.0, 70.3, 68.1, 65.1, 40.6, 17.6, 17.5, 17.45, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 14.4, 13.8, 13.4, 13.3.

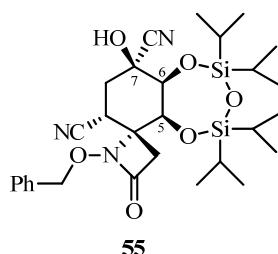
IR (KBr): ν 3430, 2947, 2891, 2869, 2250, 1747, 1631, 1465, 1388, 1256, 1155, 1138, 1067, 1045, 1006, 952, 886, 795, 696 cm⁻¹.

LRMS (EI): *m/z* 558 (M⁺, 2), 531 (3), 515 (1), 488 (29), 460 (6), 446 (10), 437 (7), 410 (15), 382 (5), 367 (12), 339 (61), 293 (5), 209 (4), 175 (5), 147 (9), 135 (10), 127 (19), 119 (12), 105 (33), 91 (100), 77 (8).

A.E. (C₂₈H₄₂N₂O₆Si₂): Hallado: C, 60.18; H, 7.58; N, 5.01.

Calculado: C, 59.57; H, 7.34; N, 5.12.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*,9*R*)-1-(Benciloxi)-7,9-diciano-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (55)**



P.f.: 191-193 °C.

R_f = 0.15 (hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.35 (5H, m, Ph), 5.17 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.4 Hz, OCH₂Ph), 5.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.4 Hz, OCH₂Ph), 4.40

(1H, S_{ancho} , H-5 o H-6), 4.31 (1H, S_{ancho} , H-6 o H-5), 3.49 (1H, S_{ancho} , H-9), 2.92 (3H, S_{ancho} , H-3 y H-8 y OH), 2.52 (1H, dd, $J = 14.1, 3.9$ Hz, H-8□), 2.14 (1H, S_{ancho} , H-3□), 1.16-0.94 (28H, m, TIPDS).

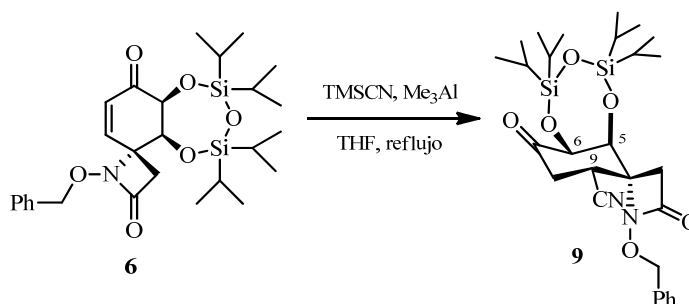
LRMS (*API-ES*⁺): m/z 559 ($M-26$)⁺, 586 ($M+H$)⁺, 608 ($M+Na$)⁺, 1193 ($2M+Na$)⁺.

IR (KBr): ν 3339, 2949, 2895, 2869, 2247, 1752, 1632, 1499, 1465, 1412, 1387, 1252, 1216, 1151, 1106, 1089, 988, 947, 927, 886, 855, 831, 786, 735, 698 cm^{-1} .

A.E. ($\text{C}_{29}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_6\text{Si}_2$): Hallado: C, 59.31; H, 7.37; N, 7.17.

Calculado: C, 59.45; H, 7.40; N, 7.17.

Método B

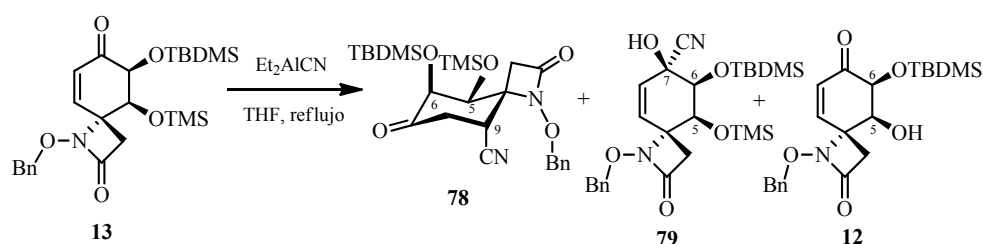


A una disolución de cianuro de trimetilsililo (152 μl , 1.117 mmol) y trimetilaluminio (2.0 M en tolueno, 0.51 ml, 1.016 mmol) en THF (1 ml) se adicionó a temperatura ambiente una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro [3.5]non-8-eno-2,7-diona (**6**) (270 mg, 0.508 mmol) en THF (2 ml). Después de calentar la mezcla a reflujo durante 16 horas, se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se redisolvió en tolueno (3 ml), se lavó sucesivamente con NH_4Cl sat. frío (2 ml) y una disolución tampón Na_2HPO_4 (0.1 M, 2 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/ AcOEt , 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,

1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**9**) (77 mg, rto. 27%)⁵⁸ como un sólido blanco.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (78**)**

Método A



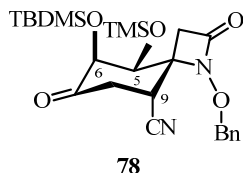
A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (160 mg, 0.337 mmol) en THF (1.5 ml) se adicionó a 0 °C cianuro de dietilaluminio (0.4 ml, disol. 1.0 M en tolueno, 0.404 mmol).⁵⁹ La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 14 horas. Pasado este tiempo, se añadió NH₄Cl sat. (2 ml) y AcOEt (2 ml), se separaron las fases y la fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 2 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 10:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**78**) (81 mg, rto. 48%), *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-7-ciano-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**79**) (35 mg, rto. 21%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetil-

⁵⁸ El moderado rendimiento obtenido se atribuye a la baja solubilidad de la β-cianocetona **9** en los disolventes orgánicos empleados en su extracción y purificación. La utilización del procedimiento de aislamiento descrito en el *Método B*, posiblemente, mejoraría estos resultados.

⁵⁹ Nagata, W.; Yoshioka, M.; Hirai, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4635-4643.

silil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (14 mg, rto. 10%), todos como sólidos blancos.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-Benciloxi-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5-(trimetilsililoxi)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**78**)**



P.f.: 136-138 °C.

R_f = 0.47 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).⁶⁰

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃):⁶¹ δ 7.40 (5H, m, Ph), 5.31 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.6 Hz, OCH₂Ph), 5.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.6 Hz, OCH₂Ph), 4.71 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-6), 4.14 (1H, d, *J* = 2.4 Hz, H-5), 3.66 (1H, dd, *J* = 12.6, 5.5 Hz, H-9), 2.92 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 14.4 Hz, H-3'), 2.76 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 14.4 Hz, H-3), 2.63 (1H, dd, *J* = 14.1, 5.5 Hz, H-8), 2.21 (1H, dd, *J* = 14.1, 12.6 Hz, H-8'), 0.85 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.10 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.08 (3H, s, SiCH₃), -0.06 (3H, s, SiCH₃).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 201.0 (C-7), 164.1, 133.9, 129.5, 129.4, 128.9, 117.1 (CN), 80.8, 78.9 (C-5), 78.0 (C-6), 67.3 (C-4), 42.2 (C-3), 38.3 (C-8), 32.0 (C-9), 25.8, 18.5, 0.5, -4.8, -5.6.

IR (KBr): ν 3425, 2956, 2927, 2855, 2233, 1772, 1631, 1478, 1454, 1364, 1255, 1107, 1064, 1031, 989, 841, 778, 749, 695 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 575 (M+73)⁺, 525 (M+Na)⁺, 503 (M+H)⁺.

⁶⁰ Cuando se revela la placa de TLC con una disolución ácida de 2,4-dinitrofenilhidrazina en EtOH, la β-cianocetona **78** presenta un color verde-azulado.

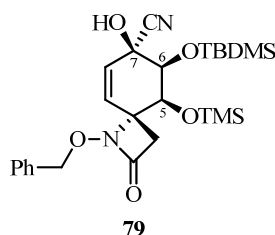
⁶¹ Para facilitar la discusión de los resultados, de las dos señales atribuibles a los protones del metileno C-3, δ 2.92 y 2.76, se asigna a H-3' (*pro-R*^{*}) la que aparece más desapantallada.

LRMS (*API-ES*⁻): *m/z* 571 (*M*+2Cl)⁻, 537 (*M*+Cl)⁻, 501 (*M*-H)⁻, 475 (*M*-27)⁻, 428 (*M*-74)⁻.

A.E. (C₂₅H₃₈N₂O₅Si₂): Hallado: C, 59.86; H, 7.85; N, 5.87.

Calculado: C, 59.72; H, 7.62; N, 5.57.

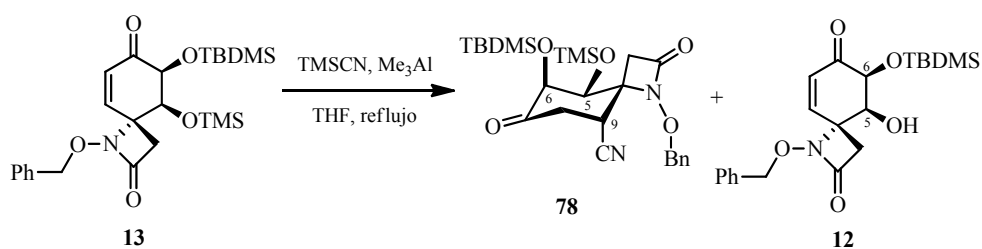
***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*S*)-1-Benciloxi-6-(*terc*-butildimetilsililoxi)-7-ciano-7-hidroxi-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (79)**



R_f = 0.38 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.36 (5H, m, Ph), 5.54 (1H, *parte A sist. AB* ancha, *J* = 9.9 Hz, H-8), 5.49 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.9 Hz, H-9), 4.99 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, OCH₂Ph), 4.80 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.7 Hz, OCH₂Ph), 4.32 (1H, s ancho, H-5), 4.04 (1H, t, *J* = 1.4 Hz, H-6), 3.22 (1H, *parte A sist. AB* ancha, *J* = 13.6 Hz, H-3), 3.00 (1H, s ancho, OH), 2.35 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 13.6 Hz, H-3'), 0.84 (9H, s, C(CH₃)₃), 0.20 (9H, s, Si(CH₃)₃), 0.19 (3H, s, SiCH₃), 0.14 (3H, s, SiCH₃).

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 525 (*M*+Na)⁺, 503 (*M*+H)⁺, 475 (*M*-27)⁺.

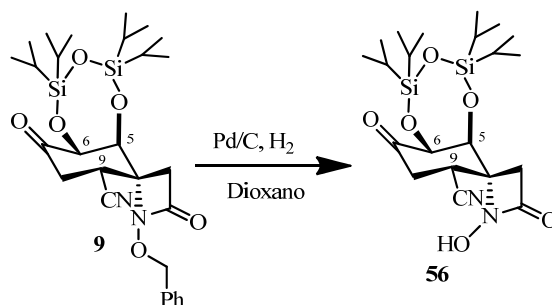
Método B

A una disolución de cianuro de trimetilsililo (126 μl , 0.926 mmol) y trimetilaluminio (2.0 M en tolueno, 0.42 ml, 0.842 mmol) en THF (1 ml) se adicionó a temperatura ambiente una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**13**) (200 mg, 0.421 mmol) en THF (1.5 ml).⁶² Después de calentar la mezcla a reflujo durante 24 horas (la disolución incolora pasa a ser naranja),⁶³ se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se redisolvió en tolueno (3 ml), se lavó sucesivamente con NH_4Cl sat. frío (2 ml) y una disolución tampón Na_2HPO_4 (0.1 M, 2 ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/ AcOEt , 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-9-ciano-5-[(trimetilsilil)oxi]-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**78**) (90 mg, rto. 42%), como un sólido blanco, y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*)-1-(benciloxi)-6-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (**12**) (30 mg, rto. 18%).

⁶² Utimoto, K.; Wakabayashi, Y.; Horiie, T.; Inoue, M.; Shishiyama, Y.; Obayashi, M.; Nozaki, H. *Tetrahedron* **1983**, 39, 967-973.

⁶³ En algunas ocasiones, para que la reacción se completara fue necesario añadir más TMSCN (0.5 equiv.) y Me_3Al (0.5 equiv.), y calentar la mezcla a reflujo otras 14 h.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-1,5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (56**)**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonano-2,7-diona (**9**) (116 mg, 0.208 mmol) en 1,4-dioxano (3.5 ml), se añadió paladio sobre carbono (10 %, 13 mg, 0.0012 mmol) bajo atmósfera de hidrógeno. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se filtró a través de Celita® y se lavó con 1,4-dioxano (15 ml). Se eliminó el disolvente a presión reducida obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-1,5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (**56**) (87 mg, 100%) como un sólido blanco.

P.f: 173-175°C.

R_f = 0.26 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz CDCl₃): δ 10.08 (1H, s. ancho, N-OH), 5.22 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5 o H-6), 4.54 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-6 o H-5), 3.76 (1H, dd, J = 12.9, 5.4 Hz, H-9), 3.10 (1H, t, J = 13.8 Hz, H-8), 2.96 (1H, *parte A sist. AB*, J = 14.5 Hz, H-3), 2.91 (1H, *parte B sist. AB*, J = 14.5 Hz, H-3'), 2.09-2.03 (1H, m, H-8'), 1.14-0.93 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 200.1, 164.4, 116.5, 79.8, 79.4, 67.8, 41.8, 38.7, 31.6, 17.5, 17.4, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 14.5, 13.7, 12.8, 12.2.

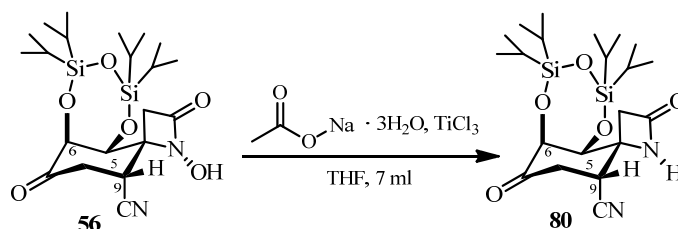
IR (film): ν 3455, 2947, 2889, 2868, 2244, 1795, 1768, 1749, 1628, 1465, 1247, 1192, 1120, 1048, 1019, 920, 885, 855, 798, 701 cm^{-1}

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 959 ($2M+Na$)⁺, 491 ($M+Na$)⁺, 492 ($M+H+Na$)⁺, 469 ($M+H$)⁺. **LRMS** (*EI*): m/z 468 (0.1), 425 (6), 409 (100), 397 (1), 380 (2), 364 (34), 339 (41), 312 (3), 289 (31), 278 (2), 261 (10), 235 (14), 207 (5), 191 (7), 175 (11), 163 (12), 147 (12), 135 (23), 119 (13), 105 (10), 91 (3), 77 (5), 43 (6).

A.E.: ($C_{21}H_{43}N_2O_6Si_2$): Hallado: C, 50.23; H, 7.29; N, 5.38.

Calculado: C, 53.81; H, 7.74; N, 5.98.

Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (80)



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-1,5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (**56**) (40 mg, 0.085 mmol) en THF (2.5 ml) se añadieron, sucesivamente, una disolución de acetato sódico trihidratado (83 mg, 0.607 mmol) en H₂O (1 ml) (disolución blanquecina) y una disolución de tricloruro de titanio (26 mg, 0.170 mmol) en H₂O (0.4 ml) (disolución verde oscura). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Pasado este tiempo, a la mezcla de reacción se le añadió AcOEt (3 ml). Se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con NaOH (0.1N, 2 x 1 ml), se secó con MgSO₄, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraiso-

propildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (**80**) (15 mg, rto. 39%) y *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-9-ciano-5,6-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro-2,7-diona (**56**) (7 mg, rto. 18%).

$R_f = 0.26$ (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz CDCl_3): δ 7.71 (1H, s. ancho, N-OH), 4.76 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5 o H-6), 4.50 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6 o H-5), 3.70 (1H, dd, $J = 12.1, 5.7$ Hz, H-9), 3.19 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3), 3.08 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.8$ Hz, H-3'), 2.88-2.70 (2H, m, H-8 y H-8'), 1.13-0.93 (28H, m, TIPDS).

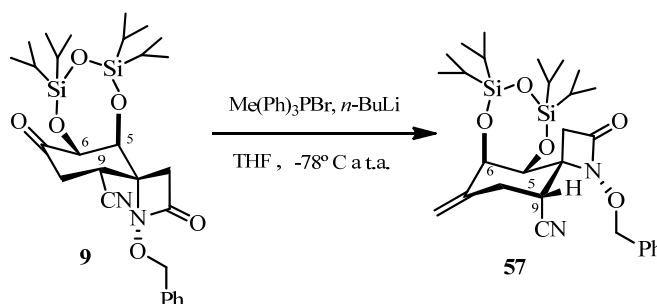
$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 200.3, 166.5, 117.3, 80.8, 79.4, 67.6, 60.9, 58.36, 47.3, 38.9, 33.2, 21.5, 17.9, 17.8, 17.7, 17.5, 17.4, 17.3, 14.9, 14.1, 13.4, 12.7.

$\text{LRMS (API-ES}^+)$: m/z 907 $(2\text{M}+3\text{H})^+$, 475 $(\text{M}+\text{Na})^+$, 454 $(\text{M}+2\text{H})^+$, 453 $(\text{M}+\text{H})^+$.

LRMS (EI) : m/z

1.3.2. Síntesis del Cianoacetal 10

1.3.2.1. Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (**57**)



A una suspensión de bromuro trifenilfosfonio (288 mg, 0.807 mmol) en THF (7 ml) se añadió gota a gota a -78°C *n*-butil litio (1.6 M en hexano, 0.50 ml, 0.807 mmol) y la disolución amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente

durante 15 minutos. Pasado este tiempo se añadió gota a gota una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nona-2,7-diona (**9**) (410 mg, 0.734 mmol) en THF (4.6 ml) y la mezcla se agitó durante 5 h a temperatura ambiente. Se añadió agua (6ml) y se separaron las fases.⁶⁴ La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 8 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1), obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**57**) (200 mg, 49%) como un sólido blanco.

P.f: 193-195°C.

R_f = 0.51 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz CDCl₃): δ 7.47-7.33 (5H, m, Ph), 5.22 (2H, d, *J* = 15.5 Hz, H-10 y H-10'), 5.15 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 5.11 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.2 Hz, OCH₂Ph), 4.79 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-6), 4.48 (1H, d, *J* = 3.4 Hz, H-5), 3.30 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3), 3.15 (1H, t, *J* = 4.0 Hz, H-9), 2.76 (1H, dd, *J* = 4.0, 13.6 Hz, H-8), 2.45 (1H, dd, *J* = 4.0, 13.6 Hz, H-8'), 2.43 (1H, d, *parte B sist. AB*, *J* = 13.9 Hz, H-3'), 1.03 (28H, d, *J* = 5.8 Hz, TIPDS).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 164.1 (C-2), 140.0 (C-7), 134.6, 129.0, 128.9, 128.6, 128.4, 118.5 (CN), 117.2 (C-10), 79.4 (OCH₂Ph), 75.6 (C-6), 71.3 (C-5), 66.6 (C-4), 40.6 (C-3), 36.2 (C-9), 31.1 (C-8), 17.6, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 14.2, 13.6, 13.0, 12.9.

IR (KBr): ν 3429, 3032, 2947, 2889, 2867, 2238, 1783, 1631, 1465, 1384, 1250, 1153, 1090, 987, 930, 886, 849, 695 cm⁻¹.

⁶⁴ Cuando se eliminó el disolvente a presión reducida en lugar de añadir agua, se observó la formación de **28** y de dos productos minoritarios cuya estructura está aún por determinar.

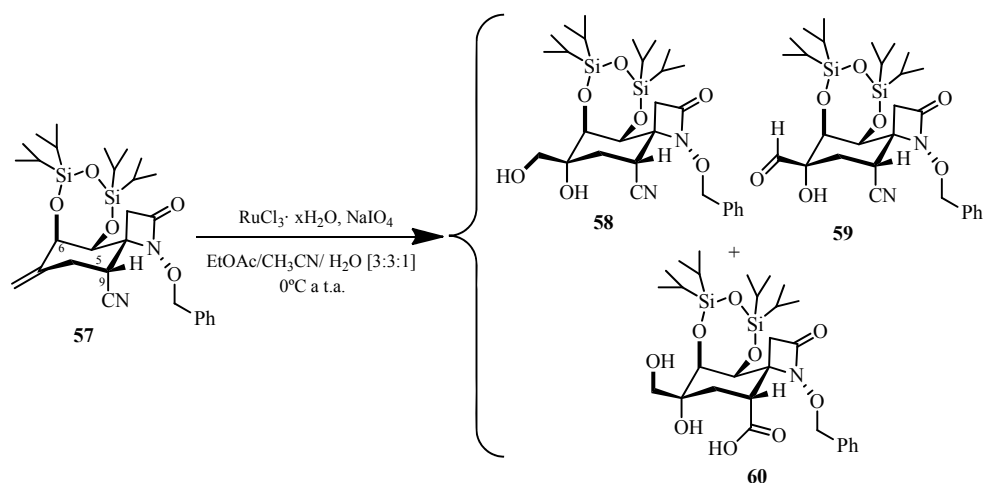
LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1135 (*M*+*Na*)⁺, 579 (*M*+*Na*)⁺, 558 (*M*+2*H*)⁺, 557 (*M*+*H*)⁺.

A.E.: (C₂₉H₄₄N₂O₅Si₂): Hallado: C, 62.37; H, 7.81; N, 4.89.

Calculado: C, 62.55; H, 7.96; N, 5.03.

1.3.2.2. Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**58**)

Método A

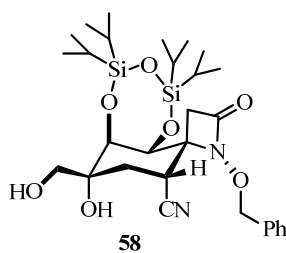


A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (**57**) (327 mg, 0.587 mmol) en AcOEt (6.6 ml) y CH₃CN (6.6 ml) se adicionó, secuencialmente y a 0 °C, una solución de tricloruro de rutenio hidratado (30 mg, 0.147 mmol) y peryodato sódico (151 mg, 0.704 mmol) en H₂O (2.2 ml). La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 10 minutos.⁶⁵ Pasado este

⁶⁵ Cuando el tratamiento de la reacción es filtrar a vacío a través de celita en lugar de añadir Na₂HPO₄, se obtiene el diol **58** con un rendimiento del 63%, la cianohidroxialdehído **59** con un rendimiento del 17% y el ácido **60** con un rendimiento del 6%, mientras que si como tratamiento de la reacción lo que hacemos es rotar los rendimientos descienden al 28% en el

tiempo, se añadió Na_2HPO_4 (0.1 M, 3.6 ml). Se separan las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (4 x 5 ml). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 2:1) *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*, 6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**58**) (229 mg, rto. 66%) como un sólido blanco, *rac*-(1*R*_N,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-7-formil-5,6,7-trihidroxi-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (**59**) (20 mg, rto. 6%) como un aceite transparente y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-(carboxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**60**) (25 mg, rto. 7%) como un sólido blanco.

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(Benciloxi)-9-ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**58**)**



P.f.: 214-216 °C.

***R*_f** = 0.37 (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.49-7.46 (2H, dd, J = 1.9, 7.8 Hz, Ph), 7.37-7.26 (3H, m, Ph), 5.21 (1H, *part A syst. AB*, J = 10.0 Hz, OCH_2Ph), 5.17 (1H, *parte B sist. AB*, J = 10.0 Hz, OCH_2Ph), 4.95 (1H, s, H-5), 4.33 (1H, d, J = 3.0 Hz, H-6),

diol **58**, 16% en la cianohidroxi-aldehído **59**, mientras que el del rendimiento del ácido **60** aumenta al 13%.

3.66 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.5$ Hz, H-10), 3.52 (1H, *parte B syst. AB*, $J = 10.5$ Hz, H-10'), 3.26 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 13.9$ Hz, H-3), 3.16 (1H, dd, $J = 4.7, 2.8$ Hz, H-9), 3.06 (1H, s. ancho, CH₂OH), 2.32 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 13.9$ Hz, H-3'), 2.17 (1H, s. ancho, OH), 2.05 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-8'), 1.91-1.87 (1H, m, H-8), 1.18-0.99 (28H, m, TIPDS).

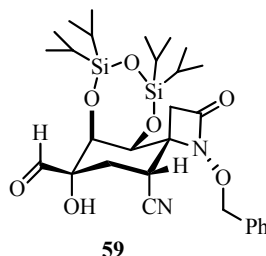
¹³C -RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 164.3 (C-2), 134.6, 128.9, 128.5, 128.3, 120.0 (CN), 79.3 (CH₂Ph), 77.2 (C-7), 74.4 (C-6), 67.8 (C-5), 66.8 (C-4), 66.4 (C-10), 40.8 (C-3), 32.4 (C-9), 29.1 (C-8), 17.7, 17.5, 17.4, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 14.3, 13.2, 12.9.

IR (KBr): ν 3468, 2946, 2890, 2866, 2243, 1774, 1633, 1464, 1384, 1248, 1151, 1101, 1071, 998, 885, 731, 697 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): m/z 1203 (2M+Na)⁺, 614 (M+Na+H)⁺, 613 (M+Na)⁺, 592 (M+2H)⁺, 591 (M+H)⁺.

LRMS (EI): m/z 590 (M⁺, 4), 547 (1), 529 (1), 517 (1), 502 (1), 468 (1), 422 (1), 408 (2), 381 (4), 369 (1), 337 (1), 309 (1), 289 (5), 261 (6), 235 (4), 207 (2), 191 (2), 175 (3), 163 (4), 135 (11), 119 (8), 91 (100), 77 (4), 65 (3).

***rac*-(1R_N,4S,5S,6S,7S,9R)-1-(Benciloxi)-9-ciano-7-formil-5,6,7-trihidroxi-5,6-O-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonan-2-ona (59)**



59

$R_f = 0.46$ (TLC, hexano/AcOEt, 1:1).

¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9.75 (1H, s, H-10), 7.49-7.41 (2H, m, Ph), 7.38-7.32 (3H, m, Ph), 5.21 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 10.2$ Hz, OCH₂Ph), 5.17 (1H,

parte B sist. AB, $J = 10.2$ Hz, OCH_2Ph), 4.88 (1H, s. ancho, H-5), 4.43 (1H, d, $J = 2.8$ Hz, H-6), 3.85- 3.70 (2H, m, CH_2OH), 3.36 (1H, t, $J = 4.5$ Hz, H-9), 3.23 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 14.0$ Hz, H-3), 2.52 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 14.0$ Hz, H-3'), 2.42 (1H, dd, $J = 14.2, 4.5$ Hz, H-8), 1.90 (1H, dd, $J = 14.2, 4.5$ Hz, H-8'), 1.06- 0.91 (28H, m, TIPDS).

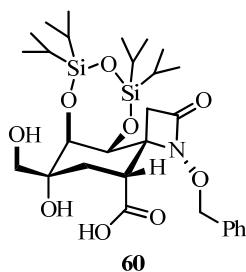
^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3): 200.4 (C-10), 164.2 (C-2), 134.6, 129.6, 129.1, 128.7, 128.3, 118.7 (CN), 79.6 (CH_2Ph), 77.2 (C-7), 76.2 (C-6), 73.0 (C-5), 66.1 (C-4), 40.8 (C-3), 31.9 (C-9), 29.7, 28.0 (C-8), 17.9, 17.6, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 16.7, 14.1, 13.9, 13.8, 13.1, 13.0.

IR (film): ν 3369, 3035, 2947, 2894, 2868, 2247, 1770, 1667, 1498, 1464, 1377, 1260, 1151, 1094, 1009, 920, 884, 801, 734, 697 cm^{-1} .

LRMS (API-ES $^+$): m/z 1265 ($2\text{M}+\text{H}^+ \text{MeOH}$) $^+$, 644 ($\text{M}+\text{MeOH}+\text{Na}$) $^+$, 621 ($\text{M}+\text{MeOH}$) $^+$, 622 ($\text{M}+\text{MeOH}+\text{H}$) $^+$, 613 ($\text{M}+\text{MeOH}$) $^+$, 591 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

LRMS (EI): m/z 588 (2), 545 (1), 503 (1), 466 (1), 424 (1), 397 (1), 367 (1), 339 (1), 263 (6), 235 (2), 207 (1), 191 (1), 163 (2), 135 (8), 119 (5), 105 (5), 91 (100), 77 (3).

***rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-(carboxi)-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (60)**



$R_f = 0.10$ (TLC, hexano/AcOEt, 1:1); 0.46 (TLC, hexano/AcOEt, 1:3).

¹³C -RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 177.7 (COOH), 163.5 (C-2), 129.0, 128.9, 128.8, 128.6, 128.2, 78.7 (CH₂Ph), 76.0 (C-6), 72.5 (C-7), 69.4 (C-4), 68.0 (C-5), 67.9 (C-10), 47.6 (C-9), 41.9 (C-3), 27.7 (C-8), 17.7, 17.52, 17.46, 17.36, 17.2, 17.1, 17.08, 17.01, 14.42, 14.40, 13.1, 12.8.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1244 (2M+Na+2H)⁺, 1242 (2M+Na+H)⁺, 1240 (2M+Na-H)⁺, 633 (M+Na+H)⁺, 632 (M+Na)⁺, 631 (M+Na-H)⁺, 611 (M+2H)⁺, 610 (M+H)⁺, 609 (M)⁺, 591 (M-H₂O)⁺.

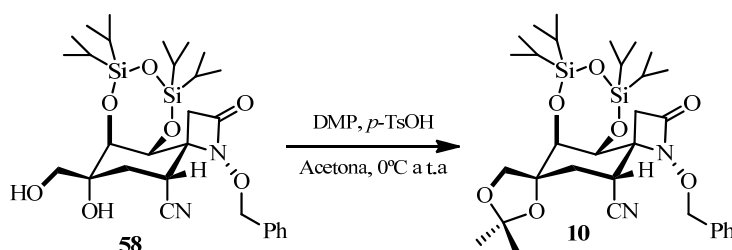
Calculado: C, 57.11; H, 7.77; N, 2.30.

Reaction scheme showing the conversion of compound **57** to compound **58** using OsO_4 , NMO, and a mixture of acetone/ H_2O /dioxane [7:1:1] at room temperature (r.t.).

397

[3.5]nonan-2-ona (**57**) (200 mg, 0.360 mmol) en acetona (7 ml) se adicionó, secuencialmente y a temperatura ambiente, agua (1 ml), *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (95 mg, 0.793 mmol), tetróxido de osmio (0.27 ml, disol. al 2.5% en peso en *t*-BuOH, 0.022 mmol) y 1,4-dioxano (1 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 días. Pasado este tiempo, se añadió una disolución acuosa de Na₂S₂O₃ (10%, 1 ml) y se agitó 15 min. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 10 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6-dihidroxi-7-metiliden-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**57**) (150 mg, rto. 75%) y *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**58**) (40 mg, rto. 21%) como un sólido blanco.

1.3.2.3. Síntesis de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10-*O*-isopropiliden-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (10**)**



A una disolución de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**58**) (113 mg, 0.191 mmol) en acetona (5 ml), se añadió secuencialmente, a 0°C, dimetoxipropano (72 µl, 60.97 mg, 0.574 mmol) y

ácido paratoluensulfónico (0.36 mg, 0.002 mmol). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante tres días. Pasado este tiempo, se eliminó el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 4:1) obteniéndose *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(bencilo-xi)-9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10-*O*-isopropiliden-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**10**) (105 mg, rto. 87%) como un sólido blanco.

P.f.: 208-210 °C.

R_f = 0.37 (TLC, hexano/AcOEt, 3:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.50-7.48 (2H, m, Ph), 7.37-7.31 (3H, m, Ph), 5.21 (1H, *parte A syst. AB*, *J* = 10.1 Hz, OCH₂Ph), 5.17 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 10.1 Hz, OCH₂Ph), 4.84 (1H, s. ancho, H-5), 4.30 (1H, d, *J* = 2.7 Hz, H-6), 4.05 (1H, *parte A syst. AB*, *J* = 9.2 Hz, H-10), 3.76 (1H, *part B syst. AB*, *J* = 9.2 Hz, H-10'), 3.23 (1H, *part A syst. AB*, *J* = 13.3 Hz, H-3), 3.16 (1H, t, *J* = 3.9 Hz, H-9), 2.32 (1H, *part B syst. AB*, *J* = 13.3 Hz, H-3'), 2.03 (2H, t, *J* = 3.4 Hz, H-8 y H-8'), 1.53 (3H, s, CH₃), 1.43 (3H, s, CH₃), 1.13-1.01 (28H, m, TIPDS).

¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 164.3 (C-2), 135.2, 129.2, 128.7, 128.5, 119.4 (CN), 81.7 (C-7), 79.6 (CH₂Ph), 76.2 (C-6), 71.9 (C-10), 68.4 (C-5), 66.5 (C-4), 41.0 (C-3), 33.3 (C-9), 30.8 (C-8), 27.2, 27.0, 17.8, 17.7, 17.5, 17.2, 17.3, 17.17, 17.13, 16.9, 14.5, 13.6, 13.3.

IR (film): ν 3538, 3092, 3070, 3035, 2946, 2893, 2868, 2730, 2243, 1952, 1785, 1498, 1465, 1415, 1383, 1371, 1285, 1257, 1213, 1150, 1127, 1090, 990, 955, 926, 885, 856, 836, 792, 778, 766, 733, 697, 665, 647 cm⁻¹.

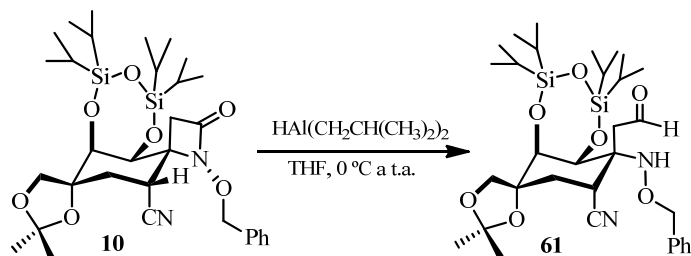
LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 1285 (2M+Na+2H)⁺, 1262 (2M+2H)⁺, 655 (M+Na+2H)⁺, 654 (M+Na+H)⁺, 653 (M+Na)⁺, 633 (M+3H)⁺, 632 (M+2H)⁺, 631 (M+H)⁺.

A.E.: (C₃₂H₅₀N₂O₇Si₂) Hallado: C, 60.92; H, 7.99; N, 4.44.

Calculado: C, 53.74; H, 8.09; N, 4.42.

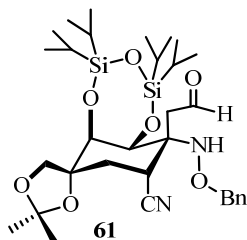
1.3.3. Síntesis del aminoalcohol 2

1.3.3.1 Síntesis del *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**)



A una disolución *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10-*O*-isopropiliden-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**10**) (30 mg, 0.048 mmol) en 1 ml de THF, se adicionó a 0 °C, hidruro de diisopropil aluminio (1.0 M en tolueno, 57 μ l, 0.058 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Pasado este tiempo se añadió una mezcla AcOEt/tartrato sódico-potásico (10%) ([1:1], 2ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (4 x 6 ml) y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 7:1) obteniéndose *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**) (21 mg, rto. 70%) como un sólido blanco y se recupero *rac*-(1*R_N*,4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,9*R*)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10-*O*-isopropiliden-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**10**) (9 mg. rto 30%).

***rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (61)**



P.f.: 151-152 °C.

R_f = 0.44 (TLC, hexano/AcOEt, 4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 9.76 (1H, t, *J* = 1.5 Hz, CH₂COH), 7.35-7.30 (5H, m, Ph), 6.12 (1H, s. ancho, NH), 4.93 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.74 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.4 Hz, OCH₂Ph), 4.44 (1H, d, *J* = 2.9 Hz, H-2), 4.27 (1H, s. ancho, H-3), 4.07 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.0 Hz, H-7'), 3.71 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.0 Hz, H-7), 3.40 (1H, s. ancho, H-6), 3.10 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 16.0 Hz, CH₂COH), 2.81 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 16.0 Hz, CH₂COH), 2.14 (2H, m, H-5), 1.47 (3H, s, CH₃), 1.36 (3H, s, CH₃), 1.06-1.01 (28H, m, TIPDS)

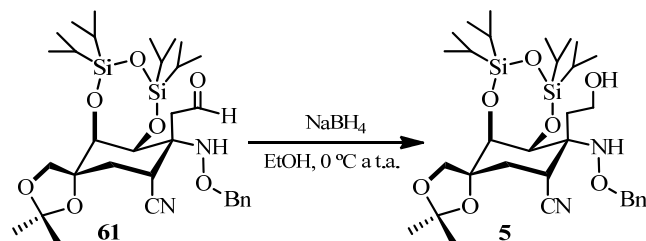
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 200.0 (CH₂COH), 136.6, 128.6, 128.4, 128.1, 119.8 (CN), 104.5 (C-(CH₃)₂), 81.9 (C-4), 77.2 (C-3), 76.8 (OCH₂Ph), 72.2 (C-7), 72.4 (C-2), 64.6 (C-1), 43.6 (CH₂COH), 30.8 (C-6), 29.6 (C-5), 27.5, 26.5, 17.7, 17.5, 17.4, 17.1, 16.9, 13.8, 13.6.

IR (film): ν 3257, 3065, 3032, 2947, 2868, 2729, 2250, 1718, 1497, 1464, 1383, 1371, 1257, 1233, 1215, 1153, 1144, 1120, 1082, 1008, 911, 885, 865, 825, 783, 734, 699 648 cm⁻¹.

LRMS (API-ES⁺): *m/z* 657 (M+Na+2H)⁺, 656 (M+Na+H)⁺, 655 (M+Na)⁺, 636 (M+4H)⁺, 635 (M+3H)⁺, 634 (M+2H)⁺, 633 (M+H)⁺.

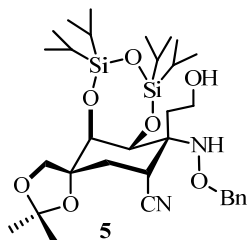
1.3.3.2. Síntesis de *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (5)

Método A



A una suspensión de *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**) (72 mg, 0.114 mmol) en etanol (3 ml), se adicionó a 0 °C, borohidruro sódico (4.78 mg, 0.125 mmol). La suspensión se dejó agitando a 0 °C durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se añadió a 0 °C, H₂O (3 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 5 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo de la reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 5:1) obteniéndose *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**5**) (72 mg, rto cuantitativo) como un sólido blanco.

***rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxi-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (5)**



P.f.: 201-203 °C.

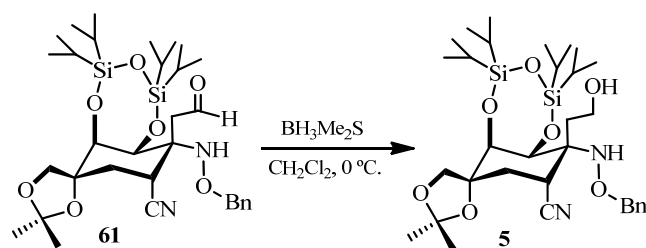
R_f = 0.20 (TLC, hexano/AcOEt, 4:1).

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.37-7.31 (5H, m, Ph), 4.89 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.84 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 11.5 Hz, OCH₂Ph), 4.54 (1H, s. ancho, H-2 o H-3), 4.40 (1H, s. ancho, H-3 o H-2), 4.09 (1H, *parte A sist. AB*, *J* = 9.0 Hz, H-7'), 3.78 (2H, s. ancho, CH₂OH), 3.73 (1H, *parte B sist. AB*, *J* = 9.0 Hz, H-7'), 3.23 (1H, s. ancho, H-6), 2.24 (1H, dt, *J* = 5.3 Hz, H-5), 2.21-2.04 (3H, m, H-5' y CH₂CH₂OH), 1.50 (3H, s, CH₃), 1.39 (3H, s, CH₃), 1.06-1.01 (28H, m, TIPDS)

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 136.3, 128.6, 128.5, 128.3, 128.1, 120.1(CN), 107.0, 82.0 (C-4), 77.2 (C-3), 76.5 (CH₂Ph), 72.4 (C-2), 71.7 (C-7), 63.8 (C-1), 58.1 (CH₂CH₂OH), 34.8 (CH₂CH₂OH), 31.8 (C-6), 30.5 (C-5), 27.6 (C-CH₃), 26.4 (C-CH₃), 17.7, 17.6, 17.4, 17.3, 17.1, 17.0, 14.1, 13.8, 13.5.

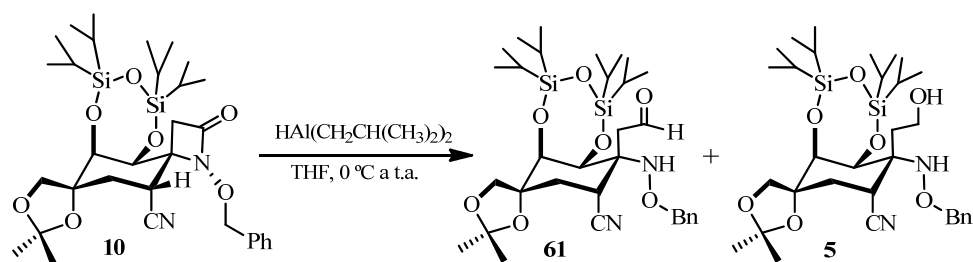
IR (KBr): ν 3458, 3031, 2946, 2895, 2868, 2727, 2241, 1727, 1639, 1465, 1382, 1370, 1322, 1256, 1216, 1152, 1123, 1085, 1006, 919, 885, 867, 829, 788, 750, 700 604, 513 cm⁻¹.

LRMS (*API-ES*⁺): *m/z* 659 (M+Na+2H)⁺, 658 (M+Na+H)⁺, 657 (M+Na)⁺, 637 (M+3H)⁺, 636 (M+2H)⁺, 635 (M+H)⁺.

Método B

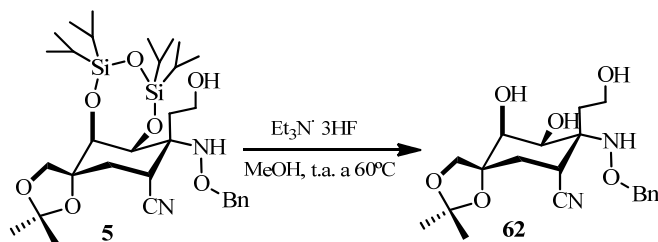
A una disolución de *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**) (160 mg, 0.253 mmol) en CH₂Cl₂ seco (3.5 ml), se adicionó a 0 °C, sulfuro de dimetil borano (1.0 M en CH₂Cl₂, 0.28 ml, 0.278 mmol). La disolución resultante se agitó a 0 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se añadió, a 0 °C, una disolución de cloruro amónico saturado (3.5 ml) y CH₂Cl₂ (3 ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 6 ml). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo de la reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**5**) (73 mg, rto 46%) como un aceite transparente y recuperándose *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**) (72 mg, rto. 45%).

Método C



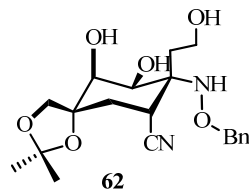
A una disolución de *rac*-(1 R_N ,4 R ,5 S ,6 S ,7 R ,9 R)-1-(benciloxi)-9-ciano-5,6,7,10-tetrahidroxi-7,10-*O*-isopropiliden-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (**10**) (105 mg, 0.166 mmol) en THF (4.5 ml), se adicionó a 0°C , hidruro de diisopropil aluminio (1.0 M en tolueno, 0.2 ml, 0.200 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 19 horas. Pasado este tiempo se añadió una mezcla AcOEt: tartrato sódico-potásico (10%) ([1:1], 4ml). Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con AcOEt (4 x 6 ml) y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 8:1) obteniéndose *rac*-(1 R ,2 S ,3 S ,4 R ,6 R)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-1-(2-oxoetil)-2,3,4,7-tetrahidroxi-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**61**) (40 mg, rto. 38%) como un sólido blanco y *rac*-(1 R ,2 S ,3 S ,4 R ,6 R)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietil)-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**5**) (43 mg, rto 41%) como un aceite transparente.

1.3.3.3. Síntesis de *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietyl)-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-ciclohexano (62)



A una disolución de *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietyl)-4-metil-4,7-*O*-isopropiliden-2,3-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-ciclohexano (**5**) (36 mg, 0.057 mmol) en metanol (2 ml), bajo atmósfera de argón y a temperatura ambiente, se adicionó el complejo trietilamina ácido fluorhídrico (7 μ l, 0.043 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente. Se añadió sucesivamente el complejo de trietilamina ácido fluorhídrico a las 24 horas (14 μ l, 0.086 mmol) y a las 72 horas (28 μ l, 0.162 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Pasado este tiempo se calentó a 60°C durante 24 horas. Se añadió, a temperatura ambiente, el complejo de trietilamina ácido fluorhídrico (28 μ l, 0.162 mmol) y la disolución se calentó a 60°C durante 5 días. Pasado este tiempo, se añadió AcOEt (3 ml). Se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 2ml), se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (AcOEt) obteniéndose *rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietyl)-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-ciclohexano (**62**) (23 mg, rto. cuantitativo) como un sólido blanco.

***rac*-(1*R*,2*S*,3*S*,4*R*,6*R*)-1-[(Benciloxi)amino]-6-ciano-2,3,4,7-tetrahidroxi-1-(2-hidroxietyl)-4,7-*O*-isopropiliden-4-metil-ciclohexano (62)**



P.f.: 168-170°C.

R_f = 0.35 (TLC, AcOEt).

^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3): δ 7.42 (2H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz, Ph), 7.36-7.28 (3H, m, Ph), 6.46 (1H, s, NH), 4.85 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 11.3$ Hz, OCH_2Ph), 4.70 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 11.3$ Hz, OCH_2Ph), 4.58 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, C(2)-OH), 4.12 (1H, *parte A sist. AB*, $J = 9.4$ Hz, H-7), 4.13-4.05 (3H, m, C(3)-OH, H-3, CH_2OH), 3.94 (1H, dd, $J = 3.9, 2.7$ Hz, H-2), 3.86-3.81 (2H, m, CH_2OH), 3.82 (1H, *parte B sist. AB*, $J = 9.4$ Hz, H-7'), 3.05 (1H, dd, $J = 12.9, 3.5$ Hz, H-6), 2.42 (1H, dt, $J = 14.4, 6.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 2.22 (1H, t, H-5), 2.02 (1H, dd, $J = 12.9, 3.5$ Hz, H-5), 1.84 (1H, dt $J = 14.4, 6.0$ Hz), 1.38 (3H, s, CH_3).

^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3): δ 139.5, 129.9, 129.7, 129.1, 121.9 (CN), 108.7, 84.5 (C-4), 78.4 (CH_2Ph), 72.9 (C-2), 70.8 (C-3), 68.0 (C-7), 65.5 (C-1), 58.6 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 36.5 (C-5), 36.0 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 33.2 (C-6), 31.1, 29.9 (C- CH_3), 26.8 (C- CH_3).

IR (KBr): ν 3478, 3420, 3261, 3031, 2978, 2943, 2918, 2572, 2528, 2417, 2248, 1702, 1496, 1457, 1379, 1369, 1335, 1256, 1233, 1216, 1150, 1080, 1048, 1021, 996, 959, 933, 854, 837, 800, 743, 699, 656, 513 cm^{-1} .

LRMS (*API-ES*⁺): m/z 809 ($\text{M}+\text{Na}+2\text{H}$)⁺, ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$)⁺, 416 ($\text{M}+\text{Na}+\text{H}$)⁺, 415 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 395 ($\text{M}+3\text{H}$)⁺, 394 ($\text{M}+2\text{H}$)⁺, 393 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

ANEXO A _____

DATOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

ANEXO A: DATOS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS-X¹**A.1. Difracción de Rayos X de *rac*-(1R_N)1-Benciloxi-1-azaespiro[3.5]nona-5,8-dieno-2,7-diona (**19**)*****Preparación de la muestra.***

La espiro-β-lactama **19** se recrystalizó en Et₂O (0.6 ml, disol. 65 mM, 39 μmol) por difusión de hexano a temperatura ambiente (7 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *Enraf-Nonius CAD4*. La radiación utilizada fue MoKα, usándose un monocromador de grafito. El método de medida fue ω/2θ-scan. El programa utilizado para la evaluación fue *WINGX*, las intensidades fueron corregidas del factor de Lorente-polarización. La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXS-97* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXL-97*.

Resultados.**Tabla A.1.** Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₃ NO ₃
Peso molecular	255.26
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Ortorrómbico, Pcab
Dimensiones celda unidad	a = 8.358(7) Å b = 11.388(2) Å c = 28.213(7) Å

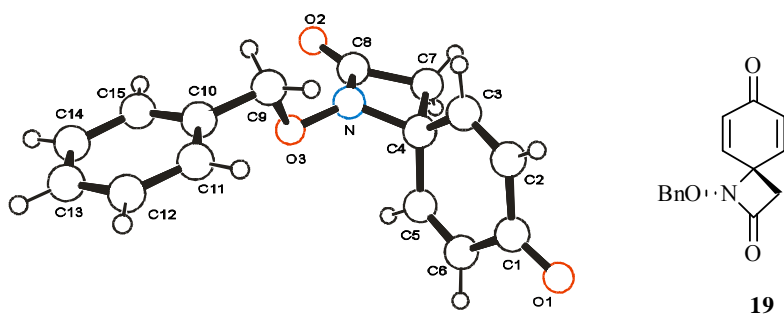
¹ Los espectros de difracción de rayos X y la resolución de las correspondientes estructuras de las espiro-β-lactamas **3**, **12**, **19**, **22**, **81**, **82** y **83** fueron realizadas por el Dr. Xavier Solans en el Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Depósitos Minerales de la Universidad de Barcelona. Por otra parte, la determinación estructural por difracción de rayos X de la ciano-β-lactama **57** fue realizada por los Drs. Lluís Solà y Jordi Benet-Buchholz en la Unidad de Investigación de Polimorfismo del Instituto Catalán de Investigación Química de Tarragona.

Volumen	2685(2) Å ³
Z, Densidad calculada	8, 1.263 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	0.089 mm ⁻¹
F(000)	1072

Tabla A.2. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente (Å² $\times 10^3$). U(eq) se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij}.

	x	y	z	U(eq)
O(1)	2372(3)	-2592(2)	6076(1)	78(1)
O(2)	2258(3)	3560(2)	5207(1)	82(1)
O(3)	1875(2)	2496(2)	6186(1)	52(1)
C(8)	2467(4)	2563(3)	5332(1)	56(1)
C(1)	2405(4)	-1553(3)	5966(1)	53(1)
C(2)	3914(5)	-896(4)	5948(1)	57(1)
C(3)	3989(4)	189(3)	5793(1)	52(1)
C(4)	2584(4)	821(2)	5609(1)	46(1)
C(5)	1049(4)	180(4)	5679(1)	53(1)
C(6)	967(5)	-902(4)	5838(1)	57(1)
C(7)	2786(5)	1370(3)	5104(1)	58(1)
N	2499(3)	2063(2)	5766(1)	53(1)
C(9)	3158(5)	2886(6)	6497(2)	82(2)
C(10)	2379(4)	3388(3)	6925(1)	58(1)
C(11)	2424(5)	2786(4)	7342(2)	97(1)
C(12)	1723(9)	3243(6)	7740(2)	146(3)
C(13)	975(9)	4264(8)	7720(3)	173(4)
C(14)	874(9)	4870(6)	7318(3)	146(3)
C(15)	1614(5)	4439(4)	6912(2)	94(1)

Figura A.1. Representación de la estructura molecular de la espiro-β-lactama **19**.



A.2. Difracción de Rayos X de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*)-1-Benciloxi-6-(*terc*-butil-dimetilsililoxi)-5-hidroxi-1-azaespiro[3.5]non-8-eno-2,7-diona (12)

Preparación de la muestra.

El silil éter **12** se recrystalizó en Et₂O (0.6 ml, disol. 42 mM, 25 μmol) por difusión de hexano a temperatura ambiente (6 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *MarResearch MAR345* con detector *Image plate*. La radiación utilizada fue MoKα, usándose un monocromador de grafito. El método de medida fue φ-scan. El programa utilizado para la evaluación fue *WINGX*, las intensidades fueron corregidas del factor de Lorente-polarización. La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXS-97* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXL-97*.

Resultados.

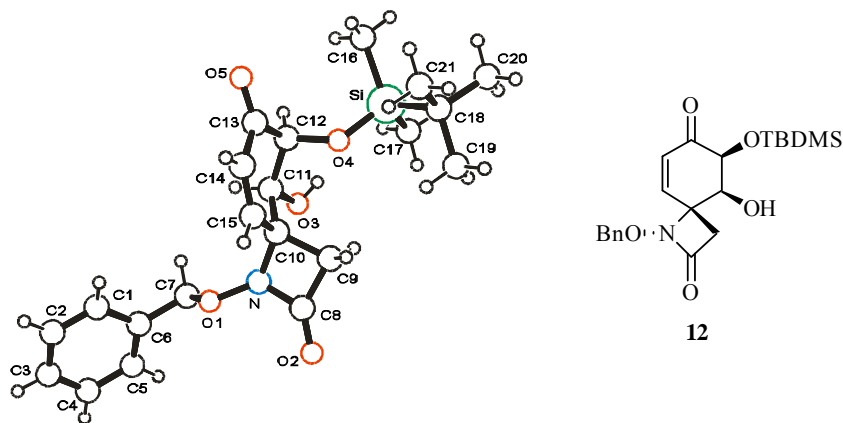
Tabla A.3. Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₉ NO ₅ Si
Peso molecular	403.54
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /c
Dimensiones celda unidad	a = 24.9570(10) Å b = 7.8220(10) Å c = 11.5760(10) Å β = 92.2070(10)°
Volumen	2258.1(4) Å ³
Z, Densidad calculada	4, 1.187 Mg/m ³
Coefficiente de absorción μ	0.133 mm ⁻¹
F(000)	864

Tabla A.4. Coordenadas atómicas (x 10⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente (Å² x 10³). U(eq) se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij}.

	x	y	z	U(eq)
Si	1354(1)	4300(2)	3824(2)	77(1)
O(1)	3942(2)	7425(5)	3388(3)	78(1)
O(2)	3264(2)	10511(5)	3803(4)	81(1)
O(3)	2772(2)	5453(4)	5102(3)	83(1)
O(4)	1944(1)	4772(4)	3271(3)	71(1)
O(5)	2436(2)	1848(5)	1822(4)	95(1)
N	3404(2)	7585(5)	3627(4)	71(1)
C(1)	5028(3)	5810(7)	3142(6)	77(2)
C(2)	5543(3)	5917(10)	2872(7)	104(2)
C(3)	5882(3)	6929(10)	3532(9)	111(3)
C(4)	5703(4)	7864(9)	4425(8)	104(2)
C(5)	5167(3)	7764(8)	4672(6)	89(2)
C(6)	4819(2)	6762(7)	4062(6)	72(2)
C(7)	4241(3)	6634(10)	4331(6)	104(2)
C(8)	3121(2)	9067(7)	3627(5)	68(2)
C(9)	2604(2)	8103(6)	3400(5)	64(2)
C(10)	2956(2)	6507(6)	3204(4)	60(1)
C(11)	2866(2)	4907(6)	3931(5)	63(1)
C(12)	2424(2)	3796(6)	3422(5)	66(2)
C(13)	2552(2)	3246(9)	2208(5)	75(2)
C(14)	2814(3)	4538(8)	1514(5)	81(2)
C(15)	2991(3)	6005(8)	1950(6)	86(2)
C(16)	1233(3)	1961(8)	3670(9)	132(3)
C(17)	1349(3)	5018(12)	5338(6)	121(3)
C(18)	862(2)	5564(7)	2940(6)	83(2)
C(19)	992(4)	7483(9)	3052(8)	137(3)
C(20)	289(3)	5290(11)	3361(8)	131(3)
C(21)	878(4)	5033(13)	1648(8)	149(3)

Figura A.2. Representación de la estructura molecular del silil éter **12**.



A.3. Difracción de Rayos X de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*)-1-Benciloxi-5,6,7-trihidroxi-7-(hidroximetil)-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]non-8-en-2-ona (**22**)

Preparación de la muestra.

El diol **22** se recrystalizó en AcOEt (0.6 ml, disol. 20 mM, 12 μ mol) por difusión de Et₂O a temperatura ambiente (7 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *MarResearch MAR345* con un detector *Image plate*. La radiación utilizada fue MoK α , usándose un monocromador de grafito. El método de medida fue ϕ -scan. El programa utilizado para la evaluación fue *WINGX*, las intensidades fueron corregidas del factor de Lorente-polarización. La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXS-97* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXL-97*.

Resultados.

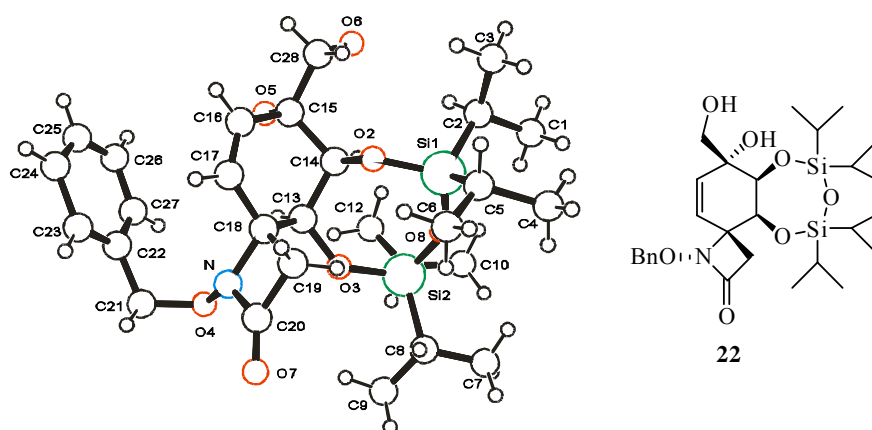
Tabla A.5. Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₂₈ H ₄₅ NO ₇ Si ₂
Peso molecular	563.83
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /c
Dimensiones celda unidad	a = 10.567(6) Å b = 10.669(4) Å c = 27.751(12) Å
	β = 97.82(3)°
Volumen	3100(2) Å ³
Z, Densidad calculada	4, 1.208 Mg/m ³
Coefficiente de absorción μ	0.157 mm ⁻¹
F(000)	1216
Tamaño del cristal	0.2 x 0.2 x 0.1 mm ³
Rango θ para la colección de datos	3.53 a 31.88°
Reflexiones recogidas	22495

Reflexiones independientes	7444 [R(int) = 0.0690]
Calidad de ajuste F^2	1.222
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0868, wR2 = 0.1839
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1537, wR2 = 0.2142

Tabla A.6. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). U(eq) se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij} .

	x	y	z	U(eq)
Si(1)	6181(1)	8717(1)	1397(1)	61(1)
Si(2)	8197(1)	6682(1)	1493(1)	68(1)
O(1)	7191(2)	7682(3)	1646(1)	83(1)
O(2)	6219(2)	8665(2)	812(1)	50(1)
O(3)	8381(2)	6897(2)	931(1)	61(1)
O(4)	9800(2)	6454(2)	-19(1)	74(1)
O(5)	5198(2)	6266(2)	-92(1)	63(1)
O(6)	3398(2)	7245(3)	375(1)	80(1)
O(7)	11228(2)	8600(3)	499(1)	90(1)
N	9420(2)	7663(3)	81(1)	59(1)
C(1)	4584(5)	7768(6)	2055(2)	117(2)
C(2)	4577(3)	8282(4)	1538(1)	74(1)
C(3)	3609(4)	9320(5)	1431(2)	99(1)
C(4)	6751(7)	10430(8)	2162(2)	161(3)
C(5)	6650(5)	10369(5)	1589(2)	112(2)
C(6)	7755(5)	10873(6)	1421(2)	122(2)
C(7)	9795(9)	7160(11)	2359(3)	234(5)
C(8)	9782(5)	7004(6)	1842(2)	116(2)
C(9)	10822(7)	6385(9)	1672(3)	193(4)
C(10)	7295(8)	4819(8)	2078(3)	182(3)
C(11)	7705(7)	5032(6)	1581(2)	134(2)
C(12)	6889(8)	4451(8)	1202(3)	184(3)
C(13)	7546(2)	7100(3)	496(1)	49(1)
C(14)	6195(2)	7485(3)	570(1)	42(1)
C(15)	5365(2)	7544(3)	72(1)	48(1)
C(16)	6002(3)	8231(3)	-298(1)	53(1)
C(17)	7236(3)	8437(3)	-239(1)	58(1)
C(18)	8134(2)	8046(3)	190(1)	47(1)
C(19)	8902(3)	9127(3)	467(1)	59(1)
C(20)	10101(3)	8469(4)	370(1)	64(1)
C(21)	10081(4)	6348(4)	-511(1)	81(1)
C(22)	8947(4)	6450(4)	-874(2)	78(1)
C(23)	8887(6)	7334(6)	-1225(2)	124(2)
C(24)	7680(9)	7293(9)	-1578(3)	157(3)
C(25)	6795(9)	6480(11)	-1511(3)	160(3)
C(26)	6873(8)	5647(9)	-1163(3)	161(3)
C(27)	7981(6)	5656(6)	-851(2)	117(2)
C(28)	4069(3)	8081(4)	111(1)	63(1)

Figura A.3. Representación de la estructura molecular del diol **22**.

A.4. Difracción de Rayos X de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,8*S*,9*S*)-1-Benciloxi-6-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7-ciano-8,9-dihidroxi-5,7-bis(trimetilsililoxi)-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (81**)**

Preparación de la muestra.

La *O*-sililcianhidrina **81** se recrystalizó en AcOEt (0.6 ml, disol. 27 mM, 16 μ mol) por difusión de hexano a temperatura ambiente (7 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *Enraf-Nonius CAD4*. La radiación utilizada fue MoK α , usándose un monocromador de grafito. El método de medida fue $\omega/2\Theta$ -scan. El programa utilizado para la evaluación fue *WINGX*, las intensidades fueron corregidas del factor de Lorente-polarización. La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXS-97* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXL-97*.

Resultados.**Tabla A.7.** Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₂₈ H ₄₈ N ₂ O ₇ Si ₃
Peso molecular	608.95
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /n
Dimensiones celda unidad	a = 13.862(13) Å b = 19.504(7) Å c = 26.674(12) Å β = 102.28(5)°
Volumen	7047(8) Å ³
Z, Densidad calculada	8, 1.148 Mg/m ³
Coefficiente de absorción μ	0.176 mm ⁻¹
F(000)	2624

Tabla A.8. Coordenadas atómicas (x 10⁴) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente (Å² x 10³). U(eq) se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij}.²

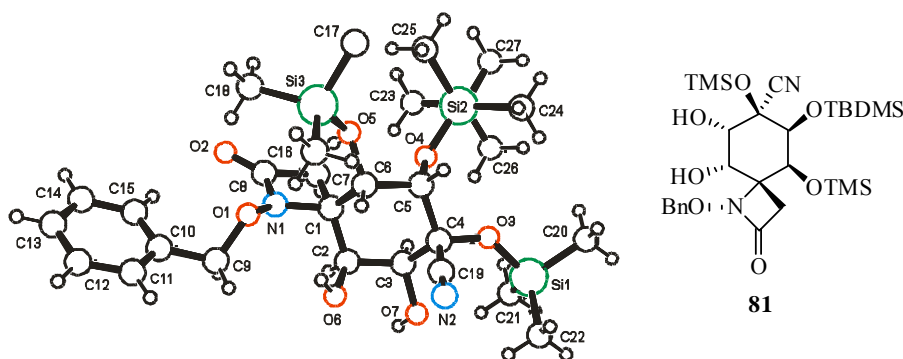
	x	y	z	U (eq)
Si (1A)	10695 (1)	7051 (1)	2392 (1)	55 (1)
Si (2A)	7587 (1)	8399 (1)	2027 (1)	52 (1)
Si (3A)	4928 (1)	6645 (1)	2085 (1)	60 (1)
N (1A)	5967 (2)	5965 (2)	1053 (1)	53 (1)
N (2A)	8846 (3)	5566 (2)	2735 (1)	75 (1)
O (1A)	5483 (2)	5429 (1)	1228 (1)	53 (1)
O (2A)	4846 (2)	6471 (1)	383 (1)	68 (1)
O (3A)	9469 (2)	7063 (1)	2308 (1)	42 (1)
O (4A)	7694 (2)	7604 (1)	1834 (1)	43 (1)
O (5A)	5926 (2)	6894 (1)	1887 (1)	53 (1)
O (6A)	7818 (2)	5321 (1)	1505 (1)	64 (1)
O (7A)	9576 (2)	5990 (1)	1585 (1)	60 (1)
C (1A)	6855 (3)	6351 (2)	1323 (1)	43 (1)
C (2A)	7820 (3)	5984 (2)	1294 (1)	48 (1)
C (3A)	8721 (2)	6395 (2)	1566 (1)	42 (1)
C (4A)	8702 (2)	6612 (2)	2106 (1)	39 (1)
C (5A)	7700 (2)	6992 (2)	2109 (1)	42 (1)
C (6A)	6820 (2)	6536 (2)	1868 (1)	42 (1)
C (7A)	6499 (3)	6889 (2)	905 (1)	53 (1)
C (8A)	5609 (3)	6442 (2)	711 (2)	50 (1)
C (9A)	5595 (3)	4786 (2)	977 (2)	63 (1)

² La estructura presenta dos moléculas en la unidad asimétrica indicándose los átomos de la primera con la letra A y los de la segunda con la letra B.

C(10A)	4594(3)	4482(2)	756(2)	51(1)
C(11A)	4336(3)	3874(2)	904(2)	68(1)
C(12A)	3441(4)	3584(3)	688(2)	89(2)
C(13A)	2780(4)	3938(3)	327(2)	86(2)
C(14A)	3017(3)	4564(3)	172(2)	79(1)
C(15A)	3953(3)	4837(2)	391(2)	71(1)
C(16A)	5153(3)	5843(2)	2442(2)	98(2)
C(17A)	4619(3)	7337(2)	2493(2)	92(2)
C(18A)	3888(3)	6548(2)	1521(2)	82(1)
C(19A)	8776(3)	6012(2)	2455(2)	45(1)
C(20A)	11046(3)	7809(2)	2800(2)	81(1)
C(21A)	11117(3)	7183(3)	1783(2)	102(2)
C(22A)	11241(3)	6269(2)	2712(2)	91(2)
C(23A)	6270(3)	8593(3)	2020(2)	119(2)
C(24A)	8290(3)	8530(2)	2683(2)	92(2)
C(25A)	8055(4)	8927(2)	1574(2)	77(1)
C(26A)	9115(6)	8777(4)	1583(3)	205(4)
C(27A)	7972(4)	9686(3)	1668(2)	112(2)
C(28A)	7407(6)	8800(3)	1022(2)	184(3)
Si(1B)	4427(1)	8447(1)	-648(1)	57(1)
Si(2B)	1911(1)	9027(1)	370(1)	50(1)
Si(3B)	-938(1)	8029(1)	-710(1)	60(1)
N(1B)	548(2)	6331(2)	-140(1)	49(1)
N(2B)	2032(3)	7631(2)	-1577(2)	75(1)
O(1B)	-195(2)	6174(1)	-560(1)	50(1)
O(2B)	-174(2)	6229(1)	572(1)	64(1)
O(3B)	3311(2)	8340(1)	-525(1)	48(1)
O(4B)	2014(2)	8260(1)	122(1)	38(1)
O(5B)	53(2)	7744(1)	-303(1)	45(1)
O(6B)	1976(2)	6290(1)	-778(1)	68(1)
O(7B)	3774(2)	6888(1)	-527(1)	58(1)
C(1B)	1315(2)	6871(2)	-134(1)	41(1)
C(2B)	2243(3)	6607(2)	-288(2)	52(1)
C(3B)	3022(2)	7164(2)	-296(1)	44(1)
C(4B)	2617(2)	7807(2)	-591(1)	38(1)
C(5B)	1699(2)	8056(2)	-392(1)	38(1)
C(6B)	918(2)	7495(2)	-447(1)	38(1)
C(7B)	1324(2)	6916(2)	445(1)	46(1)
C(8B)	437(3)	6442(2)	342(2)	49(1)
C(9B)	-88(3)	5480(2)	-750(2)	76(1)
C(10B)	-764(4)	5437(2)	-1254(2)	66(1)
C(11B)	-1693(4)	5175(3)	-1307(2)	93(2)
C(12B)	-2359(5)	5189(4)	-1798(3)	128(2)
C(13B)	-2045(7)	5450(4)	-2183(3)	139(3)
C(14B)	-1127(7)	5684(4)	-2147(3)	139(3)
C(15B)	-495(4)	5688(3)	-1679(3)	102(2)
C(16B)	-643(3)	8835(2)	-1012(2)	107(2)
C(17B)	-1837(3)	8172(3)	-296(2)	106(2)
C(18B)	-1398(3)	7408(2)	-1221(2)	81(1)
C(19B)	2296(3)	7686(2)	-1144(2)	51(1)
C(20B)	4568(3)	8043(2)	-1246(2)	85(2)
C(21B)	4520(3)	9383(2)	-704(2)	110(2)
C(22B)	5402(3)	8129(2)	-105(2)	88(2)
C(23B)	692(3)	9112(2)	542(2)	91(2)
C(24B)	2047(3)	9695(2)	-94(2)	81(1)

C (25B)	2913 (3)	9061 (2)	946 (2)	65 (1)
C (26B)	2743 (4)	8529 (3)	1345 (2)	121 (2)
C (27B)	3931 (3)	8931 (3)	802 (2)	112 (2)
C (28B)	2956 (4)	9762 (3)	1216 (2)	101 (2)

Figura A.4. Representación de la estructura molecular de la *O*-sililcianhidrina **81**.



A.5. Difracción de Rayos X de *rac*-(4*R*,5*S*,6*S*,7*R*,8*S*,9*S*)-1-Benciloxi-6-(*tert*-butildimetilsililoxi)-7-ciano-7,9-dihidroxi-5,8-bis(trimetilsililoxi)-1-azaespiro [3.5]nonan-2-ona (82**)**

Preparación de la muestra.

La cianhidrina **82** se recrystalizó en AcOEt (1.0 ml, disol. 15 mM, 15 μ mol) por difusión de hexano inicialmente a 4 °C (5 días) y después a temperatura ambiente (5 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *MarResearch MAR3200* con un detector *Image plate*. La radiación utilizada fue MoK α , usándose un monocromador de grafito. El método de medida fue ϕ -scan, tomándose 180 fotografías en intervalos de 1° para el valor de ϕ . El programa utilizado para la evaluación de las fotografías fue el *MARXDS*, las intensidades fueron corregidas del factor de Lorente-polarización con el programa *MARSCALE*. La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXS-97* y refinada por el método de

mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXL-97*.

Resultados.

Tabla A.9. Datos del cristal.

Fórmula empírica	$C_{28}H_{48}N_2O_7Si_3$
Peso molecular	608.95
Temperatura (K)	293(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $P2_1/c$
Dimensiones celda unidad	$a = 11.4160(10) \text{ Å}$ $b = 22.2850(10) \text{ Å}$ $c = 14.8440(10) \text{ Å}$ $\beta = 104.760(10)^\circ$
Volumen	$3651.8(4) \text{ Å}^3$
Z, Densidad calculada	4, 1.108 Mg/m^3
Coefficiente de absorción μ	0.170 mm^{-1}
F(000)	1312

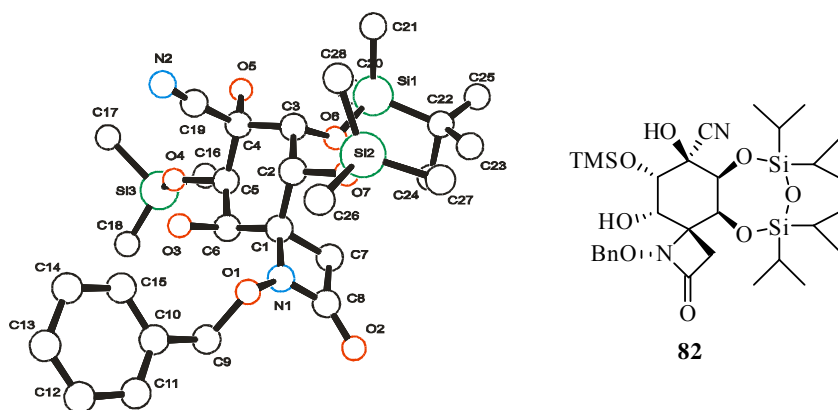
Tabla A.10. Coordenadas atómicas ($\times 10^4$) y parámetros de desplazamiento isotrópico equivalente ($\text{Å}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ se define como un tercio de la traza del tensor ortogonalizado U_{ij} .³

	x	y	z	$U(\text{eq})$
Si(1)	1134(1)	3283(1)	4989(1)	70(1)
Si(2)	2580(2)	1056(1)	4724(1)	82(1)
O(1)	5491(3)	1142(1)	6946(2)	63(1)
O(2)	3641(3)	1163(1)	8128(2)	72(1)
O(3)	6292(3)	2369(1)	6568(2)	66(1)
O(4)	5967(3)	3552(1)	6484(2)	65(1)
O(5)	3912(3)	3710(1)	4978(2)	61(1)
O(6)	2353(2)	2897(1)	5505(2)	52(1)
O(7)	2765(3)	1651(1)	5389(2)	63(1)
N(1)	4663(3)	1553(1)	7066(2)	57(1)
N(2)	5761(4)	2753(2)	4304(3)	78(1)
C(1)	4282(3)	2134(1)	6595(2)	47(1)
C(2)	3716(4)	2070(2)	5549(2)	56(1)
C(3)	3279(4)	2677(2)	5134(2)	53(1)
C(4)	4319(3)	3133(1)	5292(2)	45(1)
C(5)	4899(4)	3200(1)	6351(2)	52(1)

³ La posición de un átomo de silicio (Si3) y varios grupos metilénicos están desordenados, un factor de ocupación de 0.5 fue considerado en cada posición de acuerdo a la altura de los picos observados en la Síntesis de Fourier.

C(6)	5266(4)	2604(2)	6831(2)	54(1)
C(7)	3362(4)	2149(2)	7204(2)	53(1)
C(8)	3865(4)	1539(2)	7575(2)	55(1)
C(9)	6566(4)	1165(2)	7734(3)	60(1)
C(10)	7607(4)	888(2)	7431(3)	63(1)
C(11)	8273(5)	452(2)	7949(3)	86(2)
C(12)	9307(6)	238(2)	7739(5)	105(2)
C(13)	9628(6)	447(3)	7014(5)	112(2)
C(14)	8913(6)	856(3)	6419(4)	110(2)
C(15)	7916(5)	1088(2)	6662(4)	86(1)
Si(3)	6281(7)	4179(3)	7068(4)	92(2)
C(16)	5060(30)	4598(12)	7100(20)	197(16)
C(17)	7050(20)	4647(8)	6249(18)	192(10)
C(18)	7380(30)	4116(14)	8044(15)	280(20)
Si(3')	6170(6)	4279(2)	6633(3)	70(1)
C(16')	4821(16)	4634(7)	6916(14)	71(4)
C(17')	6414(14)	4600(5)	5535(9)	108(4)
C(18')	7546(17)	4393(9)	7372(17)	166(8)
C(19)	5182(4)	2932(2)	4756(3)	57(1)
C(20)	1298(6)	4079(3)	5313(5)	129(2)
C(21)	827(6)	3213(2)	3705(3)	102(2)
C(22)	-113(7)	2974(4)	5416(5)	115(2)
C(23)	-345(14)	2376(6)	5497(11)	116(4)
C(24)	278(18)	3182(6)	6541(12)	99(5)
C(25)	-1220(40)	3232(13)	5090(30)	200(16)
C(23')	-354(14)	2311(6)	4869(10)	123(5)
C(24')	81(19)	2822(9)	6373(14)	129(6)
C(25')	-1280(20)	3451(10)	5030(19)	98(5)
C(26)	3829(15)	495(7)	5045(10)	136(5)
C(27)	1343(16)	659(8)	4967(12)	151(6)
C(28)	2645(18)	1260(6)	3583(8)	129(6)
C(26')	3840(30)	941(12)	4400(20)	284(16)
C(27')	2680(20)	429(6)	5448(11)	153(6)
C(28')	1310(30)	1185(11)	3640(20)	370(30)

Figura A.5. Representación de la estructura molecular de la cianhidrina **82**.



A.6. Difracción de Rayos X de *rac*-(4*S*,5*R*,6*R*,7*R*,8*S*,9*S*)-1-benciloxi-7-(benzoiloximetil)-6-(*terc*-butildimetilsililoxi)-5-ciano-5,7,8,9-tetrahidroxi-8,9-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (47)

Preparación de la muestra.

La cianhidrina **47** se recrystalizó en AcOEt (0.5 ml, disol. 20 mM, 12 μ mol) por difusión de hexano a 4 °C (2 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *Bruker-Nonius* equipado con un detector de área *APPEX-2 4K CCD*, un ánodo-rotor *FR591* con radiación $\text{MoK}\alpha$, espejos *Montel* como monocromador y un dispositivo de la baja temperatura de *Kryoflex* ($T = 100 \text{ K}$). Los programas utilizados para la recolección, reducción y corrección de la absorción de datos fueron, respectivamente: *Apex2 v.1.0-22* (*Bruker-Nonius* 2004), *Saint+ v.6.22* (*Bruker-Nonius* 2001) y *SADABS v.2.10* (2003). La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXSTL v.6.10* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXSTL v.6.10*.

Resultados.

Tabla A.11. Datos del cristal.

Fórmula empírica	$\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Si}_3$
Peso molecular	841.22
Temperatura (K)	100(2)
Longitud de onda (\AA)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, $\text{P2}_1/\text{n}$
Dimensiones celda unidad	$a = 11.9912(10) \text{ \AA}$ $a = 90^\circ$ $b = 14.7024(13) \text{ \AA}$ $b = 94.365(2)^\circ$ $c = 25.768(2) \text{ \AA}$ $g = 90^\circ$
Volumen	$4529.7(7) \text{ \AA}^3$
Z, Densidad calculada	4, 1.234 Mg/m^3
Coefficiente de absorción μ	0.160 mm^{-1}
F(000)	1808
Tamaño del cristal	$0.4 \times 0.3 \times 0.2 \text{ mm}^3$

Rango θ para la colección de datos	2.75 a 39.60°
Reflexiones recogidas	90625
Reflexiones independientes	26303 [R(int) = 0.0463]
Calidad de ajuste F^2	1.034
Índices R final [$I > 2\sigma(I)$]	R1 = 0.0514, wR2 = 0.1380
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0677, wR2 = 0.1533

Tabla A.12. Longitudes de enlace [Å].

Si(1)-O(1)	1.6358(6)	Si(3)-C(39)	1.876(5)	C(17)-C(18)	1.5325(15)
Si(1)-O(2)	1.6712(6)	Si(3')-O(10)	1.7189(7)	C(20)-C(21)	1.4868(11)
Si(1)-C(7)	1.8662(9)	Si(3')-C(38')	1.858(2)	C(21)-C(26)	1.3950(12)
Si(1)-C(10)	1.8798(8)	Si(3')-C(37')	1.876(2)	C(21)-C(22)	1.3998(11)
O(1)-Si(2)	1.6420(6)	Si(3')-C(39')	1.878(6)	C(22)-C(23)	1.3946(13)
C(1)-O(2)	1.4195(8)	C(4)-O(10)	1.4098(9)	C(23)-C(24)	1.3915(15)
C(1)-C(2)	1.5378(9)	C(4)-C(5)	1.5601(11)	C(24)-C(25)	1.3896(15)
C(1)-C(3)	1.5447(10)	C(5)-O(5)	1.4219(9)	C(25)-C(26)	1.3927(14)
N(1)-C(27)	1.1492(13)	C(5)-C(27)	1.4872(12)	C(28)-C(29)	1.5315(11)
Si(2)-O(3)	1.6557(6)	C(5)-C(6)	1.5452(10)	C(30)-C(31)	1.5033(13)
Si(2)-C(13)	1.8659(9)	C(6)-C(28)	1.5575(10)	C(31)-C(36)	1.3930(12)
Si(2)-C(17)	1.8721(10)	O(6)-C(20)	1.3581(11)	C(31)-C(32)	1.3940(14)
C(2)-O(3)	1.4142(8)	O(6)-C(19)	1.4370(10)	C(32)-C(33)	1.3974(17)
C(2)-C(6)	1.5305(10)	C(7)-C(9)	1.5322(15)	C(33)-C(34)	1.3900(18)
N(2)-C(29)	1.3702(11)	C(7)-C(8)	1.5387(13)	C(34)-C(35)	1.384(2)
N(2)-O(9)	1.3842(9)	O(7)-C(20)	1.2120(11)	C(35)-C(36)	1.3942(16)
N(2)-C(6)	1.4861(9)	O(8)-C(29)	1.2172(10)	C(39)-C(41)	1.534(4)
C(3)-O(4)	1.4328(9)	O(9)-C(30)	1.4535(10)	C(39)-C(40)	1.539(5)
C(3)-C(19)	1.5341(11)	C(10)-C(11)	1.5359(13)	C(39)-C(42)	1.566(10)
C(3)-C(4)	1.5564(11)	C(10)-C(12)	1.5396(14)	C(39')-C(42')	1.501(10)
Si(3)-O(10)	1.6854(7)	C(13)-C(15)	1.5313(15)	C(39')-C(41')	1.504(7)
Si(3)-C(38)	1.863(2)	C(13)-C(14)	1.5407(17)		
Si(3)-C(37)	1.876(2)	C(16)-C(17)	1.5411(15)		

Tabla A.13. Ángulos de enlace [°].

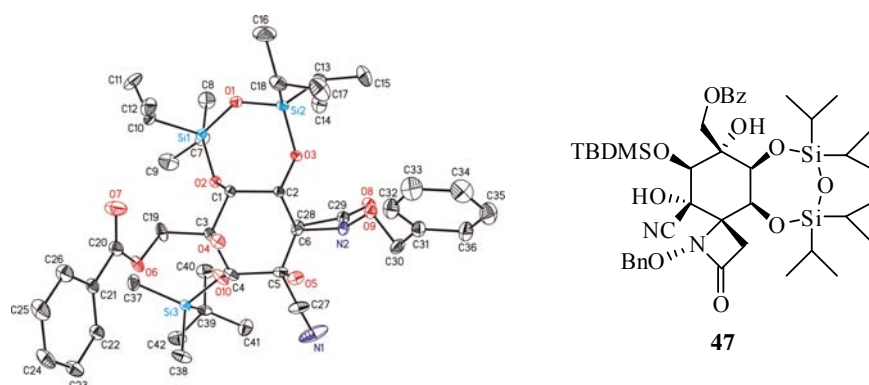
O(1)-Si(1)-O(2)	107.81(3)	C(13)-Si(2)-C(17)	117.49(4)
O(1)-Si(1)-C(7)	111.13(4)	C(1)-O(2)-Si(1)	121.94(4)
O(2)-Si(1)-C(7)	103.22(3)	O(3)-C(2)-C(6)	107.16(6)
O(1)-Si(1)-C(10)	107.58(4)	O(3)-C(2)-C(1)	112.68(5)
O(2)-Si(1)-C(10)	111.65(3)	C(6)-C(2)-C(1)	112.47(5)
C(7)-Si(1)-C(10)	115.24(4)	C(29)-N(2)-O(9)	125.28(7)
Si(1)-O(1)-Si(2)	134.92(4)	C(29)-N(2)-C(6)	95.06(6)
O(2)-C(1)-C(2)	111.75(6)	O(9)-N(2)-C(6)	124.86(6)
O(2)-C(1)-C(3)	109.90(5)	C(2)-O(3)-Si(2)	129.79(5)

C(2)-C(1)-C(3)	112.44(5)	O(4)-C(3)-C(19)	110.50(6)
O(1)-Si(2)-O(3)	108.19(3)	O(4)-C(3)-C(1)	109.40(6)
O(1)-Si(2)-C(13)	108.05(4)	C(19)-C(3)-C(1)	107.34(6)
O(3)-Si(2)-C(13)	104.61(4)	O(4)-C(3)-C(4)	103.07(6)
O(1)-Si(2)-C(17)	106.28(4)	C(19)-C(3)-C(4)	111.86(7)
O(3)-Si(2)-C(17)	111.90(4)	C(1)-C(3)-C(4)	114.63(6)
O(10)-Si(3)-C(38)	106.57(7)	C(18)-C(17)-C(16)	111.29(9)
O(10)-Si(3)-C(37)	115.66(7)	C(18)-C(17)-Si(2)	115.44(8)
C(38)-Si(3)-C(37)	109.41(11)	C(16)-C(17)-Si(2)	110.07(8)
O(10)-Si(3)-C(39)	105.15(14)	O(6)-C(19)-C(3)	110.39(7)
C(38)-Si(3)-C(39)	112.18(14)	O(7)-C(20)-O(6)	123.36(8)
C(37)-Si(3)-C(39)	107.91(14)	O(7)-C(20)-C(21)	124.07(8)
O(10)-Si(3')-C(38')	108.22(7)	O(6)-C(20)-C(21)	112.56(7)
O(10)-Si(3')-C(37')	116.06(8)	C(26)-C(21)-C(22)	120.19(8)
C(38')-Si(3')-C(37')	105.47(15)	C(26)-C(21)-C(20)	117.21(7)
O(10)-Si(3')-C(39')	104.04(18)	C(22)-C(21)-C(20)	122.56(7)
C(38')-Si(3')-C(39')	112.12(18)	C(23)-C(22)-C(21)	119.71(8)
C(37')-Si(3')-C(39')	111.1(2)	C(24)-C(23)-C(22)	119.85(9)
O(10)-C(4)-C(3)	112.92(7)	C(25)-C(24)-C(23)	120.45(9)
O(10)-C(4)-C(5)	109.20(6)	C(24)-C(25)-C(26)	120.05(9)
C(3)-C(4)-C(5)	109.79(5)	C(25)-C(26)-C(21)	119.74(9)
O(5)-C(5)-C(27)	105.40(6)	N(1)-C(27)-C(5)	178.24(13)
O(5)-C(5)-C(6)	110.11(6)	C(29)-C(28)-C(6)	86.08(5)
C(27)-C(5)-C(6)	109.18(7)	O(8)-C(29)-N(2)	132.48(8)
O(5)-C(5)-C(4)	111.25(6)	O(8)-C(29)-C(28)	136.34(8)
C(27)-C(5)-C(4)	109.52(7)	N(2)-C(29)-C(28)	91.16(6)
C(6)-C(5)-C(4)	111.21(6)	O(9)-C(30)-C(31)	106.72(7)
N(2)-C(6)-C(2)	110.94(5)	C(36)-C(31)-C(32)	119.01(9)
N(2)-C(6)-C(5)	113.04(6)	C(36)-C(31)-C(30)	120.44(9)
C(2)-C(6)-C(5)	110.36(6)	C(32)-C(31)-C(30)	120.55(8)
N(2)-C(6)-C(28)	85.95(5)	C(31)-C(32)-C(33)	120.52(10)
C(2)-C(6)-C(28)	115.65(6)	C(34)-C(33)-C(32)	119.97(11)
C(5)-C(6)-C(28)	118.65(6)	C(35)-C(34)-C(33)	119.67(10)
C(20)-O(6)-C(19)	114.78(7)	C(34)-C(35)-C(36)	120.49(10)
C(9)-C(7)-C(8)	110.81(8)	C(31)-C(36)-C(35)	120.32(10)
C(9)-C(7)-Si(1)	112.65(7)	C(41)-C(39)-C(40)	108.5(3)
C(8)-C(7)-Si(1)	115.42(7)	C(41)-C(39)-C(42)	107.5(3)
N(2)-O(9)-C(30)	110.41(6)	C(40)-C(39)-C(42)	109.6(4)
C(11)-C(10)-C(12)	109.02(8)	C(41)-C(39)-Si(3)	112.9(3)
C(11)-C(10)-Si(1)	110.35(7)	C(40)-C(39)-Si(3)	110.6(2)
C(12)-C(10)-Si(1)	114.81(6)	C(42)-C(39)-Si(3)	107.7(4)
C(4)-O(10)-Si(3)	129.91(5)	C(42')-C(39')-C(41')	110.3(5)
C(4)-O(10)-Si(3')	122.21(5)	C(42')-C(39')-C(40')	107.0(5)
Si(3)-O(10)-Si(3')	23.60(2)	C(41')-C(39')-C(40')	108.4(6)
C(15)-C(13)-C(14)	109.46(9)	C(42')-C(39')-Si(3')	110.8(5)
C(15)-C(13)-Si(2)	113.98(8)	C(41')-C(39')-Si(3')	109.9(4)
C(14)-C(13)-Si(2)	109.99(6)	C(40')-C(39')-Si(3')	110.3(4)

Tabla A.14. Ángulos de torsión [°].

O(2)-Si(1)-O(1)-Si(2)	6.76(7)	O(9)-N(2)-C(6)-C(2)	34.60(9)
C(7)-Si(1)-O(1)-Si(2)	-105.68(6)	C(29)-N(2)-C(6)-C(5)	129.82(6)
C(10)-Si(1)-O(1)-Si(2)	127.30(6)	O(9)-N(2)-C(6)-C(5)	-89.97(8)
Si(1)-O(1)-Si(2)-O(3)	10.22(7)	C(29)-N(2)-C(6)-C(28)	10.34(6)
Si(1)-O(1)-Si(2)-C(13)	122.95(6)	O(9)-N(2)-C(6)-C(28)	150.54(7)
Si(1)-O(1)-Si(2)-C(17)	-110.11(6)	O(3)-C(2)-C(6)-N(2)	52.72(7)
C(2)-C(1)-O(2)-Si(1)	-96.90(6)	C(1)-C(2)-C(6)-N(2)	177.08(6)
C(3)-C(1)-O(2)-Si(1)	137.54(5)	O(3)-C(2)-C(6)-C(5)	178.80(5)
O(1)-Si(1)-O(2)-C(1)	45.00(6)	C(1)-C(2)-C(6)-C(5)	-56.84(7)
C(7)-Si(1)-O(2)-C(1)	162.67(6)	O(3)-C(2)-C(6)-C(28)	-43.01(7)
C(10)-Si(1)-O(2)-C(1)	-72.96(6)	C(1)-C(2)-C(6)-C(28)	81.35(7)
O(2)-C(1)-C(2)-O(3)	47.74(8)	O(5)-C(5)-C(6)-N(2)	60.87(8)
C(3)-C(1)-C(2)-O(3)	171.88(6)	C(27)-C(5)-C(6)-N(2)	-54.39(8)
O(2)-C(1)-C(2)-C(6)	-73.52(7)	C(4)-C(5)-C(6)-N(2)	-175.35(6)
C(3)-C(1)-C(2)-C(6)	50.62(8)	O(5)-C(5)-C(6)-C(2)	-64.02(7)
C(6)-C(2)-O(3)-Si(2)	167.26(5)	C(27)-C(5)-C(6)-C(2)	-179.28(6)
C(1)-C(2)-O(3)-Si(2)	43.03(8)	C(4)-C(5)-C(6)-C(2)	59.76(7)
O(1)-Si(2)-O(3)-C(2)	-66.37(7)	O(5)-C(5)-C(6)-C(28)	159.20(6)
C(13)-Si(2)-O(3)-C(2)	178.62(6)	C(27)-C(5)-C(6)-C(28)	43.94(9)
C(17)-Si(2)-O(3)-C(2)	50.38(7)	C(4)-C(5)-C(6)-C(28)	-77.02(8)
O(2)-C(1)-C(3)-O(4)	-167.52(6)	O(1)-Si(1)-C(7)-C(9)	-171.19(7)
C(2)-C(1)-C(3)-O(4)	67.32(8)	O(2)-Si(1)-C(7)-C(9)	73.49(8)
O(2)-C(1)-C(3)-C(19)	-47.59(8)	C(10)-Si(1)-C(7)-C(9)	-48.50(8)
C(2)-C(1)-C(3)-C(19)	-172.75(6)	O(1)-Si(1)-C(7)-C(8)	-42.53(8)
O(2)-C(1)-C(3)-C(4)	77.32(7)	O(2)-Si(1)-C(7)-C(8)	-157.85(7)
C(2)-C(1)-C(3)-C(4)	-47.84(8)	C(10)-Si(1)-C(7)-C(8)	80.16(8)
O(4)-C(3)-C(4)-O(10)	169.08(6)	C(29)-N(2)-O(9)-C(30)	-119.66(8)
C(19)-C(3)-C(4)-O(10)	50.36(8)	C(6)-N(2)-O(9)-C(30)	111.69(8)
C(1)-C(3)-C(4)-O(10)	-72.13(8)	O(1)-Si(1)-C(10)-C(11)	77.42(8)
O(4)-C(3)-C(4)-C(5)	-68.80(7)	O(2)-Si(1)-C(10)-C(11)	-164.49(7)
C(19)-C(3)-C(4)-C(5)	172.48(6)	C(7)-Si(1)-C(10)-C(11)	-47.15(8)
C(1)-C(3)-C(4)-C(5)	49.99(8)	O(1)-Si(1)-C(10)-C(12)	-46.25(7)
O(10)-C(4)-C(5)-O(5)	-168.11(6)	O(2)-Si(1)-C(10)-C(12)	71.84(7)
C(3)-C(4)-C(5)-O(5)	67.59(7)	C(7)-Si(1)-C(10)-C(12)	-170.82(7)
O(10)-C(4)-C(5)-C(27)	-52.00(8)	C(3)-C(4)-O(10)-Si(3)	-98.37(8)
C(3)-C(4)-C(5)-C(27)	-176.30(6)	C(5)-C(4)-O(10)-Si(3)	139.18(7)
O(10)-C(4)-C(5)-C(6)	68.76(8)	C(3)-C(4)-O(10)-Si(3')	-126.11(7)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-55.54(8)	C(5)-C(4)-O(10)-Si(3')	111.44(7)
C(29)-N(2)-C(6)-C(2)	-105.61(6)	C(38)-Si(3)-O(10)-C(4)	-35.81(13)
C(37)-Si(3)-O(10)-C(4)	86.03(12)	O(5)-C(5)-C(27)-N(1)	-41(4)
C(39)-Si(3)-O(10)-C(4)	-155.06(13)	C(6)-C(5)-C(27)-N(1)	77(4)
C(38)-Si(3)-O(10)-Si(3')	43.88(10)	C(4)-C(5)-C(27)-N(1)	-161(4)
C(37)-Si(3)-O(10)-Si(3')	165.72(11)	N(2)-C(6)-C(28)-C(29)	-9.22(5)
C(39)-Si(3)-O(10)-Si(3')	-75.37(12)	C(2)-C(6)-C(28)-C(29)	102.09(6)
C(38')-Si(3')-O(10)-C(4)	62.90(13)	C(5)-C(6)-C(28)-C(29)	-123.32(6)

C(37')-Si(3')-O(10)-C(4)	-55.36(17)	O(9)-N(2)-C(29)-O(8)	27.81(14)
C(39')-Si(3')-O(10)-C(4)	-177.71(18)	C(6)-N(2)-C(29)-O(8)	167.77(9)
C(38')-Si(3')-O(10)-Si(3)	-53.99(11)	O(9)-N(2)-C(29)-C(28)	-150.45(7)
C(37')-Si(3')-O(10)-Si(3)	-172.25(17)	C(6)-N(2)-C(29)-C(28)	-10.49(6)
C(39')-Si(3')-O(10)-Si(3)	65.41(17)	C(6)-C(28)-C(29)-O(8)	-168.15(10)
O(1)-Si(2)-C(13)-C(15)	173.08(8)	C(6)-C(28)-C(29)-N(2)	9.99(6)
O(3)-Si(2)-C(13)-C(15)	-71.81(9)	N(2)-O(9)-C(30)-C(31)	-162.46(7)
C(17)-Si(2)-C(13)-C(15)	52.95(9)	O(9)-C(30)-C(31)-C(36)	-127.97(9)
O(1)-Si(2)-C(13)-C(14)	-63.55(7)	O(9)-C(30)-C(31)-C(32)	51.57(11)
O(3)-Si(2)-C(13)-C(14)	51.55(7)	C(36)-C(31)-C(32)-C(33)	1.45(15)
C(17)-Si(2)-C(13)-C(14)	176.32(7)	C(30)-C(31)-C(32)-C(33)	-178.09(10)
O(1)-Si(2)-C(17)-C(18)	170.99(7)	C(31)-C(32)-C(33)-C(34)	-1.30(17)
O(3)-Si(2)-C(17)-C(18)	53.09(8)	C(32)-C(33)-C(34)-C(35)	-0.06(18)
C(13)-Si(2)-C(17)-C(18)	-67.95(9)	C(33)-C(34)-C(35)-C(36)	1.26(18)
O(1)-Si(2)-C(17)-C(16)	-62.00(8)	C(32)-C(31)-C(36)-C(35)	-0.26(15)
O(3)-Si(2)-C(17)-C(16)	-179.90(7)	C(30)-C(31)-C(36)-C(35)	179.28(10)
C(13)-Si(2)-C(17)-C(16)	59.06(9)	C(34)-C(35)-C(36)-C(31)	-1.10(17)
C(20)-O(6)-C(19)-C(3)	97.88(9)	O(10)-Si(3)-C(39)-C(41)	55.4(3)
O(4)-C(3)-C(19)-O(6)	-40.01(10)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(41)	-60.1(3)
C(1)-C(3)-C(19)-O(6)	-159.23(7)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(41)	179.3(2)
C(4)-C(3)-C(19)-O(6)	74.21(9)	O(10)-Si(3)-C(39)-C(40)	-66.3(3)
C(19)-O(6)-C(20)-O(7)	4.86(13)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(40)	178.2(2)
C(19)-O(6)-C(20)-C(21)	-174.67(7)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(40)	57.6(3)
O(7)-C(20)-C(21)-C(26)	3.29(14)	O(10)-Si(3)-C(39)-C(42)	173.9(3)
O(6)-C(20)-C(21)-C(26)	-177.18(8)	C(38)-Si(3)-C(39)-C(42)	58.5(3)
O(7)-C(20)-C(21)-C(22)	-174.41(10)	C(37)-Si(3)-C(39)-C(42)	-62.1(3)
O(6)-C(20)-C(21)-C(22)	5.12(12)	O(10)-Si(3')-C(39')-C(42')	-166.9(4)
C(26)-C(21)-C(22)-C(23)	-0.42(13)	C(38')-Si(3')-C(39')-C(42')	-50.2(5)
C(20)-C(21)-C(22)-C(23)	177.21(8)	C(37')-Si(3')-C(39')-C(42')	67.5(5)
C(21)-C(22)-C(23)-C(24)	0.04(14)	O(10)-Si(3')-C(39')-C(41')	-44.7(4)
C(22)-C(23)-C(24)-C(25)	0.21(16)	C(38')-Si(3')-C(39')-C(41')	72.0(4)
C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	-0.09(17)	C(37')-Si(3')-C(39')-C(41')	-170.3(3)
C(24)-C(25)-C(26)-C(21)	-0.28(17)	O(10)-Si(3')-C(39')-C(40')	74.8(4)
C(22)-C(21)-C(26)-C(25)	0.53(15)	C(38')-Si(3')-C(39')-C(40')	-168.5(4)
C(20)-C(21)-C(26)-C(25)	-177.22(9)	C(37')-Si(3')-C(39')-C(40')	-50.8(5)

Figura A.6 Representación de la estructura molecular de la cianhidrina **47**.

A.7. Difracción de Rayos X de *rac*-(*E*,1'*R*,4*S*,5*S*,6*S*,7*S*,8*SR*)-1-benciloxi-8,10-(cianofenilmetilendioxi)-9-metilen-11-(metoxicarbonil)-5,6,7-trihidroxi-7-metil-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaespiro[3.5]nonan-2-ona (3)

Preparación de la muestra.

El éster **3** se recrystalizó en Et₂O (1 ml, disol. 13.1 mM) por difusión de hexano (7 ml) a -78 °C (5 días). Los cristales formados se disolvieron en *t*-butil-metil eter (0.9 ml) y se cristalizaron por difusión de hexano (0.5 ml) a -18 °C (20 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *Bruker-Nonius* equipado con un detector de área *APPEX-2 4K CCD*, un ánodo-rotor *FR591* con radiación MoK α , espejos *Montel* como monocromador y un dispositivo de la baja temperatura de *Kryoflex* (T = 100 K). Los programas utilizados para la recolección, reducción y corrección de la absorción de datos fueron, respectivamente: *Apex2 v.1.0-22* (*Bruker-Nonius* 2004), *Saint+ v.6.22* (*Bruker-Nonius* 2001) y *SADABS v.2.10* (2003). La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa

SHELXSTL v.6.10 y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXSTL* v.6.10.

Resultados.

Tabla A.15. Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₄₄ H ₆₄ N ₂ O ₁₁ Si ₃
Peso molecular	853.15
Temperatura (K)	100(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /n
Dimensiones celda unidad	a = 17.477(2) Å a = 90° b = 16.391(2) Å b = 98.790(7)° c = 16.200(3) Å g = 90°
Volumen	4586.5(7) Å ³
Z, Densidad calculada	4, 1.236 Mg/m ³
Coefficiente de absorción μ	0.136 mm ⁻¹
F(000)	1832
Tamaño del cristal	0.3 x 0.05 x 0.02 mm ³
Rango θ para la colección de datos	2.75 a 28.05°
Reflexiones recogidas	14991
Reflexiones independientes	9158 [R(int) = 0.0939]
Calidad de ajuste F ²	0.973
Índices R final [I > 2 σ (I)]	R1 = 0.0777, wR2 = 0.1617
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.2191, wR2 = 0.2217

Tabla A.16. Longitudes de enlace [Å].

Si(1)-O(1)	1.637(4)	C(6)-C(7)	1.541(6)	C(26)-O(8)	1.450(5)
Si(1)-O(2)	1.634(3)	C(7)-O(10)	1.434(7)	C(27)-N(2)	1.131(11)
Si(1)-C(12)	1.855(8)	C(7)-C(8)	1.535(6)	C(28)-C(33)	1.380(7)
Si(1)-C(9)	1.869(7)	C(8)-O(5)	1.441(6)	C(28)-C(29)	1.401(8)
Si(2)-O(1)	1.640(3)	C(13)-C(12)	1.557(7)	C(33)-C(32)	1.369(9)
Si(2)-O(5)	1.660(3)	C(12)-C(14)	1.542(7)	C(29)-C(30)	1.377(12)
Si(2)-C(37)	1.835(8)	C(9)-C(10)	1.535(10)	C(32)-C(31)	1.396(9)
Si(2)-C(34)	1.867(7)	C(9)-C(11)	1.547(8)	C(30)-C(31)	1.364(10)
O(2)-C(1)	1.410(5)	C(15)-C(16)	1.535(6)	C(36)-C(34)	1.503(10)
C(1)-C(2)	1.524(9)	C(16)-O(6)	1.198(6)	C(34)-C(35)	1.538(6)
C(1)-C(8)	1.549(7)	C(16)-N(1)	1.388(7)	C(37)-C(39)	1.548(8)
C(2)-N(1)	1.501(6)	N(1)-O(7)	1.408(5)	C(37)-C(38)	1.549(7)
C(2)-C(3)	1.511(6)	O(7)-C(17)	1.437(5)	C(1L)-O(1L)	1.429(5)
C(2)-C(15)	1.552(9)	C(18)-C(19)	1.373(9)	C(1L)-C(2L)	1.536(5)
C(3)-C(24)	1.323(6)	C(18)-C(23)	1.398(6)	C(1L)-C(3L)	1.540(5)

C(3)-C(4)	1.532(6)	C(18)-C(17)	1.507(8)	C(1L)-C(4L)	1.541(5)
C(4)-O(3)	1.460(7)	C(23)-C(22)	1.398(8)	O(1L)-C(5L)	1.421(5)
C(4)-C(7)	1.503(8)	C(22)-C(21)	1.370(9)	O(1L')-C(5L')	1.427(5)
O(3)-C(5)	1.419(5)	C(21)-C(20)	1.390(7)	O(1L')-C(1L')	1.430(5)
C(5)-O(4)	1.393(7)	C(20)-C(19)	1.394(8)	C(1L')-C(2L')	1.535(5)
C(5)-C(28)	1.498(9)	C(24)-C(25)	1.485(6)	C(1L')-C(4L')	1.537(5)
C(5)-C(27)	1.515(7)	C(25)-O(9)	1.209(5)	C(1L')-C(3L')	1.538(5)
O(4)-C(6)	1.454(7)	C(25)-O(8)	1.325(6)		

Tabla A.17. Ángulos de enlace [°].

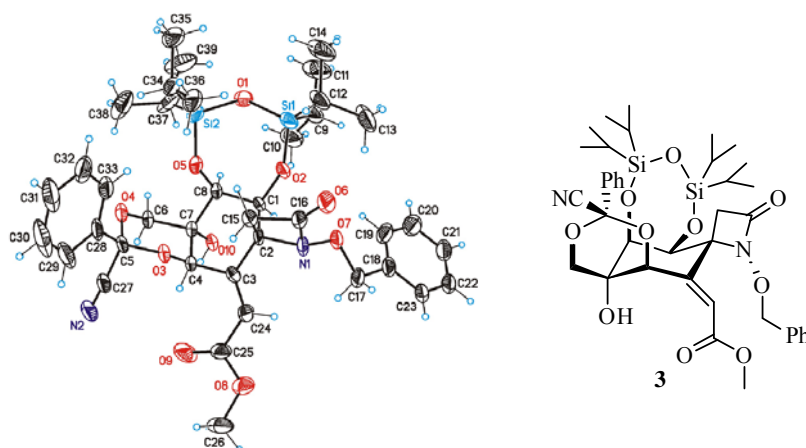
O(1)-Si(1)-O(1)	109.16(15)	C(37)-Si(2)-C(34)	113.6(3)
O(2)-Si(1)-C(12)	101.9(3)	Si(1)-O(1)-Si(2)	135.2(2)
O(1)-Si(1)-C(12)	111.2(2)	C(1)-O(2)-Si(1)	139.1(4)
O(2)-Si(1)-C(9)	112.1(2)	O(2)-C(1)-C(2)	106.7(5)
O(1)-Si(1)-C(9)	107.4(3)	O(2)-C(1)-C(8)	112.8(5)
C(12)-Si(1)-C(9)	115.0(3)	C(2)-C(1)-C(8)	113.8(4)
O(1)-Si(2)-O(5)	107.96(16)	N(1)-C(2)-C(3)	114.5(4)
O(1)-Si(2)-C(37)	108.0(3)	N(1)-C(2)-C(1)	111.2(4)
O(5)-Si(2)-C(37)	111.0(5)	C(3)-C(2)-C(1)	113.4(5)
O(1)-Si(2)-C(34)	109.1(2)	N(1)-C(2)-C(15)	86.3(4)
O(5)-Si(2)-C(34)	106.9(2)	C(3)-C(2)-C(15)	114.5(4)
C(1)-C(2)-C(15)	114.3(4)	C(16)-N(1)-C(2)	93.0(3)
C(24)-C(3)-C(2)	123.0(4)	O(7)-N(1)-C(2)	120.0(5)
C(24)-C(3)-C(4)	123.7(4)	N(1)-O(7)-C(17)	111.5(4)
C(2)-C(3)-C(4)	113.1(4)	C(19)-C(18)-C(23)	119.6(6)
O(3)-C(4)-C(7)	110.8(4)	C(19)-C(18)-C(17)	121.9(4)
O(3)-C(4)-C(3)	104.0(5)	C(23)-C(18)-C(17)	118.6(6)
C(7)-C(3)-C(4)	115.1(3)	C(18)-C(23)-C(22)	119.2(6)
C(5)-O(3)-C(4)	112.4(5)	C(21)-C(22)-C(23)	120.9(5)
O(4)-C(5)-O(3)	112.5(3)	C(22)-C(21)-C(20)	119.8(6)
O(4)-C(5)-C(28)	108.1(4)	O(7)-C(17)-C(18)	106.1(4)
O(3)-C(5)-C(28)	107.0(5)	C(21)-C(20)-C(19)	119.6(6)
O(4)-C(5)-C(27)	109.1(5)	C(18)-C(19)-C(20)	120.9(5)
O(3)-C(5)-C(27)	108.3(4)	C(3)-C(24)-C(25)	126.2(4)
C(28)-C(5)-C(27)	111.8(4)	O(9)-C(25)-O(8)	123.0(4)
C(5)-O(4)-C(6)	115.1(4)	O(9)-C(25)-C(24)	126.9(5)
O(4)-C(6)-C(7)	111.2(5)	O(8)-C(25)-C(24)	110.1(4)
O(10)-C(7)-C(4)	108.7(4)	C(25)-O(8)-C(26)	114.9(4)
O(10)-C(7)-C(8)	101.8(3)	N(2)-C(27)-C(5)	177.8(6)
C(4)-C(7)-C(8)	116.6(5)	C(33)-C(28)-C(29)	117.8(7)
O(10)-C(7)-C(6)	108.6(5)	C(33)-C(28)-C(5)	117.3(4)
C(4)-C(7)-C(6)	107.6(3)	C(29)-C(28)-C(5)	124.8(6)
C(8)-C(7)-C(6)	113.0(7)	C(32)-C(33)-C(28)	121.3(5)
O(5)-C(8)-C(7)	112.1(3)	C(30)-C(29)-C(28)	120.5(6)
O(5)-C(8)-C(1)	109.9(5)	C(33)-C(32)-C(31)	120.4(6)

C(7)-C(8)-C(1)	109.5(4)	C(31)-C(30)-C(29)	121.2(6)
C(8)-O(5)-Si(2)	119.2(3)	C(30)-C(31)-C(32)	118.7(8)
C(14)-C(12)-C(13)	110.0(4)	C(36)-C(34)-C(35)	110.7(5)
C(13)-C(12)-Si(1)	111.4(4)	C(36)-C(34)-Si(2)	112.7(3)
C(10)-C(8)-C(11)	110.2(7)	C(35)-C(34)-Si(2)	110.8(4)
C(11)-C(9)-Si(1)	111.9(4)	C(39)-C(37)-C(38)	111.0(5)
C(16)-C(15)-C(2)	85.6(4)	C(39)-C(37)-Si(2)	115.6(6)
O(6)-C(16)-N(1)	132.8(4)	C(38)-C(37)-Si(2)	112.0(5)
O(6)-C(16)-C(15)	136.0(5)	O(1L)-C(1L)-C(2L)	110.7(9)
N(1)-C(16)-C(15)	91.1(4)	O(1L)-C(1L)-C(3L)	103.6(7)
C(16)-N(1)-O(7)	118.7(3)	C(2L)-C(1L)-C(3L)	109.9(9)
C(3L)-C(1L)-C(4L)	107.7(8)	O(1L)-C(1L)-C(4L)	111.6(9)
C(5L)-O(1L)-C(1L)	115.1(7)	C(2L)-C(1L)-C(4L)	112.8(10)
C(5L')-C(1L')-C(1L')	114.5(10)	C(2L')-C(1L')-C(4L')	114.7(11)
O(1L')-C(1L')-C(2L')	108.2(9)	O(1L')-C(1L')-C(3L')	103.0(7)
O(1L')-C(1L')-C(4L')	111.6(10)	C(2L')-C(1L')-C(3L')	109.3(8)
C(4)-O(10)-Si(3')	122.21(5)	C(4L')-C(1L')-C(3L')	109.5(10)

Tabla A.18. Ángulos de torsión [°].

O(2)-Si(1)-O(1)-Si(2)	3.0(6)	C(4)-O(3)-C(5)-O(4)	-55.8(6)
C(12)-Si(1)-O(1)-Si(2)	-108.7(5)	C(4)-O(3)-C(5)-C(28)	-174.4(3)
C(9)-Si(1)-O(1)-Si(2)	124.7(5)	C(4)-O(3)-C(5)-C(27)	64.9(5)
O(5)-Si(2)-O(1)-Si(1)	-6.2(5)	O(3)-C(5)-O(4)-C(6)	53.1(6)
C(37)-Si(2)-O(1)-Si(1)	-126.3(5)	C(28)-C(5)-O(4)-C(6)	171.1(3)
C(34)-Si(2)-O(1)-Si(1)	109.6(5)	C(27)-C(5)-O(4)-C(6)	-67.1(4)
O(1)-Si(1)-O(2)-C(1)	47.8(5)	C(5)-O(4)-C(6)-C(7)	-51.8(5)
C(12)-Si(1)-O(2)-C(1)	165.5(5)	O(3)-C(4)-C(7)-O(10)	-172.4(3)
C(9)-Si(1)-O(2)-C(1)	-71.0(5)	C(3)-C(4)-C(7)-O(10)	70.0(6)
Si(1)-O(2)-C(1)-C(2)	-158.0(4)	O(3)-C(4)-C(7)-C(8)	73.2(4)
Si(1)-O(2)-C(1)-C(8)	-32.4(8)	C(3)-C(4)-C(7)-C(8)	-44.4(7)
O(2)-C(1)-C(2)-N(1)	-50.5(5)	O(3)-C(4)-C(7)-C(6)	-55.0(6)
C(8)-C(1)-C(2)-N(1)	175.6(4)	C(3)-C(4)-C(7)-C(6)	-172.6(5)
O(2)-C(1)-C(2)-C(3)	178.9(3)	O(4)-C(6)-C(7)-O(10)	168.8(3)
C(8)-C(1)-C(2)-C(3)	53.8(6)	O(4)-C(6)-C(7)-C(4)	51.3(5)
O(2)-C(1)-C(2)-C(15)	45.2(4)	O(4)-C(6)-C(7)-C(8)	-78.9(5)
C(8)-C(1)-C(2)-C(15)	-79.9(5)	O(10)-C(7)-C(8)-O(5)	166.6(4)
N(1)-C(2)-C(3)-C(24)	7.6(8)	C(4)-C(7)-C(8)-O(5)	-75.2(6)
C(1)-C(2)-C(3)-C(24)	136.6(5)	C(6)-C(7)-C(8)-O(5)	50.3(7)
C(15)-C(2)-C(3)-C(24)	-89.8(5)	O(10)-C(7)-C(8)-C(1)	-71.2(6)
N(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-177.1(6)	C(4)-C(7)-C(8)-C(1)	47.0(6)
C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-48.2(6)	C(6)-C(7)-C(8)-C(1)	172.5(5)
C(15)-C(2)-C(3)-C(4)	85.5(6)	O(2)-C(1)-C(8)-O(5)	-49.4(6)
C(24)-C(3)-C(4)-O(3)	97.3(6)	C(2)-C(1)-C(8)-O(5)	-72.3(5)
C(2)-C(3)-C(4)-O(3)	-78.0(5)	O(2)-C(1)-C(8)-C(7)	-172.9(5)
C(24)-C(3)-C(4)-C(7)	-141.4(6)	C(2)-C(1)-C(8)-C(7)	51.2(7)
C(2)-C(3)-C(4)-C(7)	43.4(7)	C(7)-C(8)-O(5)-Si(2)	-137.2(4)

C(7)-C(4)-O(3)-C(5)	58.4(4)	C(1)-C(8)-O(5)-Si(2)	100.8(4)
C(3)-C(4)-O(3)-C(5)	-177.4(3)	O(1)-Si(2)-O(5)-C(8)	-54.7(4)
C(37)-Si(2)-O(5)-C(8)	63.6(4)	C(23)-C(18)-C(17)-O(7)	159.5(4)
C(34)-Si(2)-O(5)-C(8)	-172.0(4)	C(22)-C(21)-C(20)-C(19)	0.4(8)
O(2)-Si(1)-C(12)-C(14)	-163.9(3)	C(23)-C(18)-C(19)-C(20)	-0.9(8)
O(1)-Si(1)-C(12)-C(14)	-47.7(4)	C(17)-C(18)-C(19)-C(20)	-179.4(5)
C(9)-Si(1)-C(12)-C(14)	74.6(4)	C(21)-C(20)-C(19)-C(18)	0.5(8)
O(2)-Si(1)-C(12)-C(13)	68.6(5)	C(2)-C(3)-C(24)-C(25)	171.5(6)
O(1)-Si(1)-C(12)-C(13)	-175.2(4)	C(4)-C(3)-C(24)-C(25)	-3.3(8)
C(9)-Si(1)-C(12)-C(13)	-52.9(6)	C(3)-C(24)-C(25)-O(9)	-1.5(10)
O(2)-Si(1)-C(9)-C(10)	53.4(5)	C(3)-C(24)-C(25)-O(8)	-178.8(6)
O(1)-Si(1)-C(9)-C(10)	-66.4(5)	O(9)-C(25)-O(8)-C(26)	-3.5(8)
C(12)-Si(1)-C(9)-C(10)	169.2(4)	C(24)-C(25)-O(8)-C(26)	174.0(4)
O(2)-Si(1)-C(9)-C(11)	178.1(4)	O(4)-C(5)-C(27)-N(2)	-95(18)
O(1)-Si(1)-C(9)-C(11)	58.2(5)	O(3)-C(5)-C(27)-N(2)	142(18)
C(12)-Si(1)-C(9)-C(11)	-66.1(6)	C(28)-C(5)-C(27)-N(2)	25(19)
N(1)-C(2)-C(15)-C(16)	14.0(4)	O(4)-C(5)-C(28)-C(33)	-47.3(6)
C(3)-C(2)-C(15)-C(16)	129.2(4)	O(3)-C(5)-C(28)-C(33)	74.2(6)
C(1)-C(2)-C(15)-C(16)	-97.6(4)	C(27)-C(5)-C(28)-C(33)	-167.4(5)
C(2)-C(15)-C(16)-O(6)	161.2(8)	O(4)-C(5)-C(28)-C(29)	136.7(5)
C(2)-C(15)-C(16)-N(1)	-15.1(5)	O(3)-C(5)-C(28)-C(29)	-101.9(5)
O(6)-C(16)-N(1)-O(7)	-34.1(11)	C(27)-C(5)-C(28)-C(29)	-16.5(8)
C(15)-C(16)-N(1)-O(7)	142.4(4)	C(29)-C(28)-C(33)-C(32)	-3.3(8)
O(6)-C(16)-N(1)-C(2)	-160.9(7)	C(5)-C(28)-C(33)-C(32)	-179.7(5)
C(15)-C(16)-N(1)-C(2)	15.6(5)	C(33)-C(28)-C(29)-C(30)	3.5(9)
C(3)-C(2)-N(1)-C(16)	-130.7(5)	C(5)-C(28)-C(29)-C(30)	179.5(6)
C(1)-C(2)-N(1)-C(16)	99.3(5)	C(28)-C(33)-C(32)-C(31)	2.6(9)
C(15)-C(2)-N(1)-C(16)	-15.4(4)	O(28)-C(29)-C(30)-C(31)	-2.9(10)
C(3)-C(2)-N(1)-O(7)	103.4(5)	C(29)-C(30)-C(31)-C(32)	2.1(10)
C(1)-C(2)-N(1)-O(7)	-26.6(6)	C(33)-C(32)-C(31)-C(30)	-1.9(9)
C(15)-C(2)-N(1)-O(7)	-141.3(4)	O(1)-Si(2)-C(34)-C(36)	-65.7(4)
C(16)-N(1)-O(7)-C(17)	129.3(5)	O(5)-Si(2)-C(34)-C(36)	50.8(4)
C(2)-N(1)-O(7)-C(17)	-118.0(4)	C(37)-Si(2)-C(34)-C(36)	173.6(3)
C(19)-C(18)-C(23)-C(22)	0.3(8)	O(1)-Si(2)-C(34)-C(35)	59.0(5)
C(17)-C(18)-C(23)-C(22)	179.0(5)	O(5)-Si(2)-C(34)-C(35)	175.5(4)
C(18)-C(23)-C(22)-C(21)	0.5(8)	C(37)-Si(2)-C(34)-C(35)	-61.7(4)
C(23)-C(22)-C(21)-C(20)	-0.9(9)	C(34)-Si(2)-C(37)-C(39)	-36.9(4)
N(1)-O(7)-C(17)-C(18)	176.4(4)	O(5)-Si(2)-C(37)-C(39)	-155.1(4)
C(19)-C(18)-C(17)-O(7)	-21.9(7)	C(34)-Si(2)-C(37)-C(39)	84.3(4)
O(1)-Si(2)-C(37)-C(38)	-165.5(4)	C(4L')-C(1L')-O(1L')-C(5L')	71.3(11)
O(5)-Si(2)-C(37)-C(38)	76.3(5)	C(5L')-O(1L')-C(1L')-C(2L')	-64.3(13)
C(34)-Si(2)-C(37)-C(38)	-44.2(5)	C(5L')-O(1L')-C(1L')-C(4L')	62.7(12)
C(2L)-C(1L)-O(1L)-C(5L)	-55.3(10)	C(5L')-O(1L')-C(1L')-C(3L')	-179.9(10)
C(3L)-C(1L)-O(1L)-C(5L)	-173.1(8)		

Figura A.7. Representación de la estructura molecular de **3**.

A.8. Difracción de Rayos X de *rac*-(1*R*_N,4*R*,5*S*,6*S*,9*R*)-1-benciloxi-9-ciano-5,6-dihidroxi-7-metilen-5,6-*O*-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxano-1,3-diil)-1-azaspiro[3.5]nonano-2-ona (57**)**

Preparación de la muestra.

El compuesto **57** se recrystalizó en acetato de etilo (0.5 ml, disol. 32 mM, 16 mmol) por difusión de hexano (7 ml) a -18 °C (19 días).

El cristal fue montado en un difractómetro *Bruker-Nonius* equipado con un detector de área *APPEX-2 4K CCD*, un ánodo-rotor *FR591* con radiación $\text{MoK}\alpha$, espejos *Montel* como monocromador y un dispositivo de la baja temperatura de *Kryoflex* ($T = 100 \text{ K}$). Los programas utilizados para la recolección, reducción y corrección de la absorción de datos fueron, respectivamente: *Apex2 v.1.0-22* (*Bruker-Nonius* 2004), *Saint+ v.6.22* (*Bruker-Nonius* 2001) y *SADABS v.2.10* (2003). La estructura fue resuelta por métodos directos utilizando el programa *SHELXSTL v.6.10* y refinada por el método de mínimos cuadrados, utilizando la matriz completa y el programa *SHELXSTL v.6.10*.

Resultados.**Tabla A.19.** Datos del cristal.

Fórmula empírica	C ₂₉ H ₄₄ N ₂ O ₅ Si ₂
Peso molecular	556.84
Temperatura (K)	100(2)
Longitud de onda (Å)	0.71073
Sistema cristalino, grupo espacial	Monoclínico, P2 ₁ /n
Dimensiones celda unidad	a = 13.0784(6) Å a = 90° b = 9.7911(5) Å b = 97.802(3)° c = 23.8581(13) Å g = 90°
Volumen	3026.8(3) Å ³
Z, Densidad calculada	4, 1.222 Mg/m ³
Coefficiente de absorción μ	0.156 mm ⁻¹
F(000)	1200
Tamaño del cristal	0.2 x 0.14 x 0.1 mm ³
Rango θ para la colección de datos	2.81 a 39.47°
Reflexiones recogidas	31391
Reflexiones independientes	15464 [R(int) = 0.0213]
Calidad de ajuste F ²	1.036
Índices R final [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0409, wR2 = 0.1113
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0547, wR2 = 0.1201

Tabla A.20. Longitudes de enlace [Å].

Si(1)-O(4)	1.6385(6)	O(2)-C(23)	1.4449(9)	C(14)-C(16)	1.5273(13)
Si(1)-O(3)	1.6507(5)	C(2)-C(3)	1.5541(10)	C(14)-C(15)	1.5322(13)
Si(1)-C(14)	1.86567(8)	O(3)-C(7)	1.4331(9)	C(17)-C(19)	1.5280(12)
Si(1)-C(11)	1.8753(9)	C(3)-C(8)	1.5293(10)	C(17)-C(18)	1.5300(12)
N(1)-C(1)	1.3756(10)	C(3)-C(4)	1.5302(10)	C(20)-C(21)	1.5262(13)
N(1)-O(2)	1.3892(8)	C(4)-C(9)	1.4691(10)	C(20)-C(22)	1.5280(13)
N(1)-C(3)	1.4804(9)	C(4)-C(5)	1.5370(11)	C(23)-C(24)	1.4962(11)
O(1)-C(1)	1.2056(10)	O(5)-C(8)	1.4107(9)	C(24)-C(25)	1.3867(10)
C(1)-C(2)	1.5256(10)	C(5)-C(6)	1.3293(12)	C(24)-C(29)	1.3911(11)
Si(2)-O(4)	1.6393(6)	C(6)-C(10)	1.3293(12)	C(25)-C(26)	1.3857(12)
Si(2)-O(5)	1.6414(5)	C(6)-C(7)	1.5082(10)	C(26)-C(27)	1.3825(13)
Si(2)-C(20)	1.8651(8)	C(7)-C(8)	1.5387(10)	C(27)-C(28)	1.3854(13)
Si(2)-C(17)	1.8670(8)	C(11)-C(12)	1.5296(13)	C(28)-O(29)	1.3819(12)
N(2)-C(9)	1.1493(10)	C(11)-C(13)	1.5268(12)		

Tabla A.21. Ángulos de enlace [°].

O(4)-Si(1)-O(3)	107.80(3)	O(4)-Si(2)-C(17)	108.30(3)
-----------------	-----------	------------------	-----------

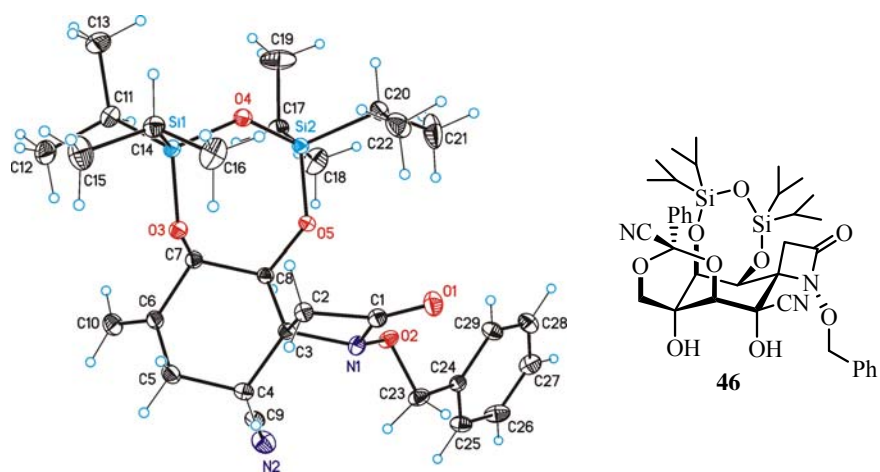
O(4)-Si(1)-C(14)	109.82(3)	O(5)-Si(2)-C(17)	110.75(3)
O(3)-Si(1)-C(14)	106.50(3)	C(20)-Si(2)-C(17)	114.81(4)
O(4)-Si(1)-C(11)	106.43(4)	N(1)-O(2)-C(23)	110.08(6)
O(3)-Si(1)-C(11)	111.67(3)	C(1)-C(2)-C(3)	86.40(5)
C(14)-Si(1)-C(11)	114.47(4)	C(7)-O(3)-Si(1)	121.68(5)
C(1)-N(1)-O(2)	125.08(6)	N(1)-C(3)-C(8)	112.53(6)
C(1)-N(1)-C(3)	95.08(5)	N(1)-C(3)-C(4)	112.94(6)
O(2)-N(1)-C(3)	124.70(6)	C(8)-C(3)-C(4)	113.11(6)
O(1)-C(1)-N(1)	131.94(7)	N(1)-C(3)-C(2)	85.89(5)
O(1)-C(1)-C(2)	137.27(7)	C(8)-C(3)-C(2)	115.17(5)
N(1)-C(1)-C(2)	90.78(6)	C(4)-C(3)-C(2)	114.46(6)
O(4)-Si(2)-O(5)	109.01(3)	Si(1)-O(4)-Si(2)	133.22(4)
O(4)-Si(2)-C(20)	108.12(3)	C(9)-C(4)-C(3)	111.42(6)
O(5)-Si(2)-C(20)	105.69(3)	C(9)-C(4)-C(5)	111.17(7)
C(3)-C(4)-C(5)	110.48(6)	C(15)-C(14)-Si(1)	113.03(6)
C(8)-O(5)-Si(2)	134.23(5)	C(19)-C(17)-C(18)	111.88(8)
C(6)-C(5)-C(4)	110.26(6)	C(19)-C(17)-Si(2)	110.73(6)
C(10)-C(6)-C(5)	123.82(7)	C(18)-C(17)-Si(2)	114.78(6)
C(10)-C(6)-C(7)	122.03(8)	C(21)-C(20)-C(22)	110.33(9)
C(5)-C(6)-C(7)	114.14(6)	C(21)-C(20)-Si(2)	112.98(6)
O(3)-C(7)-C(6)	108.23(6)	C(22)-C(20)-Si(2)	112.08(6)
O(3)-C(7)-C(8)	110.69(6)	O(2)-C(23)-C(24)	107.51(6)
C(6)-C(7)-C(8)	109.86(5)	C(25)-C(24)-C(29)	119.10(7)
O(5)-C(8)-C(3)	106.38(6)	C(25)-C(24)-C(23)	119.77(7)
O(5)-C(8)-C(7)	114.59(5)	C(29)-C(24)-C(23)	121.04(6)
C(3)-C(8)-C(7)	112.23(6)	C(26)-C(25)-C(24)	120.56(7)
N(2)-C(9)-C(4)	177.85(9)	C(27)-C(26)-C(25)	120.26(7)
C(12)-C(11)-C(13)	110.48(7)	C(26)-C(27)-C(28)	119.24(8)
C(12)-C(11)-Si(1)	115.75(6)	C(29)-C(28)-C(27)	120.77(8)
C(13)-C(11)-Si(1)	110.33(6)	C(28)-C(29)-C(24)	120.05(7)
C(16)-C(14)-C(15)	109.97(8)		
C(16)-C(14)-Si(1)	113.0(7)		

Tabla A.22. Ángulos de torsión [°].

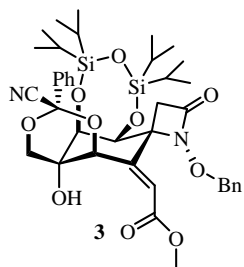
O(2)-N(1)-C(1)-O(1)	28.64(13)	C(1)-C(2)-C(3)-N(1)	-9.51(5)
C(3)-N(1)-C(1)-O(1)	168.17(9)	C(1)-C(2)-C(3)-C(8)	103.49(6)
O(2)-N(1)-C(1)-C(2)	-150.28(6)	C(1)-C(2)-C(3)-C(4)	-122.87(6)
C(3)-N(1)-C(1)-C(2)	-10.75(6)	O(3)-Si(1)-O(4)-Si(2)	-22.46(6)
C(1)-N(1)-O(2)-C(23)	-106.30(8)	C(14)-Si(1)-O(4)-Si(2)	-138.10(5)
C(3)-N(1)-O(2)-C(23)	125.53(7)	C(11)-Si(1)-O(4)-Si(2)	97.47(6)
O(1)-C(1)-C(2)-C(3)	-168.61(10)	O(5)-Si(2)-O(4)-Si(1)	33.24(6)
N(1)-C(1)-C(2)-C(3)	10.21(5)	C(20)-Si(2)-O(4)-Si(1)	147.68(5)
O(4)-Si(1)-O(3)-C(7)	58.89(6)	C(17)-Si(2)-O(4)-Si(1)	-87.34(6)
C(14)-Si(1)-O(3)-C(7)	176.70(6)	N(1)-C(3)-C(4)-C(9)	58.20(8)
C(11)-Si(1)-O(3)-C(7)	-57.67(6)	C(8)-C(3)-C(4)-C(9)	-71.06(8)
C(1)-N(1)-C(3)-C(8)	-105.01(6)	C(2)-C(3)-C(4)-C(9)	154.35(6)

O(2)-N(1)-C(3)-C(8)	34.76(9)	N(1)-C(3)-C(4)-C(5)	-177.70(6)
C(1)-N(1)-C(3)-C(4)	125.43(6)	C(8)-C(3)-C(4)-C(5)	53.03(8)
O(2)-N(1)-C(3)-C(4)	-94.80(8)	C(2)-C(3)-C(4)-C(5)	-81.56(8)
C(1)-N(1)-C(3)-C(2)	105.57(6)	O(4)-Si(2)-O(5)-C(8)	-60.91(7)
O(2)-N(1)-C(3)-C(2)	150.34(6)	C(20)-Si(2)-O(5)-C(8)	-176.93(7)
C(17)-Si(2)-O(5)-C(8)	58.14(7)	O(4)-Si(1)-C(14)-C(16)	57.66(7)
C(9)-C(4)-C(5)-C(6)	69.63(8)	O(3)-Si(1)-C(14)-C(16)	-58.80(7)
C(3)-C(4)-C(5)-C(6)	-54.61(8)	C(11)-Si(1)-C(14)-C(16)	177.29(6)
C(4)-C(5)-C(6)-C(10)	-120.82(8)	O(4)-Si(1)-C(14)-C(15)	-177.20(6)
C(4)-C(5)-C(6)-C(7)	57.90(8)	O(3)-Si(1)-C(14)-C(15)	66.34(7)
Si(1)-O(3)-C(7)-C(6)	141.63(5)	C(11)-Si(1)-C(14)-C(15)	-57.57(8)
Si(1)-O(3)-C(7)-C(8)	-97.92(6)	O(4)-Si(2)-C(17)-C(19)	-65.26(8)
C(10)-C(6)-C(7)-O(3)	-115.97(8)	O(5)-Si(2)-C(17)-C(19)	175.25(7)
C(5)-C(6)-C(7)-O(3)	65.28(8)	C(20)-Si(2)-C(17)-C(19)	55.66(8)
C(10)-C(6)-C(7)-C(8)	123.07(8)	O(4)-Si(2)-C(17)-C(18)	166.89(7)
C(5)-C(6)-C(7)-C(8)	-55.68(8)	O(5)-Si(2)-C(17)-C(18)	47.40(8)
Si(2)-O(5)-C(8)-C(3)	151.78(6)	C(20)-Si(2)-C(17)-C(18)	-72.19(7)
Si(2)-O(5)-C(8)-C(7)	27.15(10)	O(4)-Si(2)-C(20)-C(21)	177.45(8)
N(1)-C(3)-C(8)-O(5)	52.48(7)	O(5)-Si(2)-C(20)-C(21)	-65.93(9)
C(4)-C(3)-C(8)-O(5)	-178.04(5)	C(17)-Si(2)-C(20)-C(21)	56.43(9)
C(2)-C(3)-C(8)-O(5)	-43.79(8)	O(4)-Si(2)-C(20)-C(22)	-57.16(7)
N(1)-C(3)-C(8)-C(7)	178.55(5)	O(5)-Si(2)-C(20)-C(22)	59.46(6)
C(4)-C(3)-C(8)-C(7)	-51.97(7)	C(17)-Si(2)-C(20)-C(22)	-178.18(6)
C(2)-C(3)-C(8)-C(7)	82.28(7)	N(1)-O(2)-C(23)-C(24)	169.91(6)
O(3)-C(7)-C(8)-O(5)	53.36(8)	O(2)-C(23)-C(24)-C(25)	141.60(8)
C(6)-C(7)-C(8)-O(5)	172.84(6)	O(2)-C(23)-C(24)-C(29)	-41.92(10)
O(3)-C(7)-C(8)-C(3)	-68.11(7)	C(29)-C(24)-C(25)-C(26)	-1.14(13)
C(6)-C(7)-C(8)-C(3)	51.36(8)	C(23)-C(24)-C(25)-C(26)	175.41(8)
C(3)-C(4)-C(9)-N(2)	-115(3)	C(24)-C(25)-C(26)-C(27)	0.36(15)
C(5)-C(4)-C(9)-N(2)	121(3)	C(25)-C(26)-C(27)-C(28)	0.44(15)
O(4)-Si(1)-C(11)-C(12)	-163.42(6)	C(26)-C(27)-C(28)-C(29)	-0.45(15)
O(3)-Si(1)-C(11)-C(12)	-46.03(7)	C(27)-C(28)-C(29)-C(24)	-0.33(14)
C(14)-Si(1)-C(11)-C(12)	75.07(7)	C(25)-C(24)-C(29)-C(28)	1.12(13)
O(4)-Si(1)-C(11)-C(13)	70.21(7)	C(23)-C(25)-C(29)-C(28)	-175.38(8)
O(3)-Si(1)-C(11)-C(13)	-172.39(6)		
C(14)-Si(1)-C(11)-C(13)	-51.29(7)		

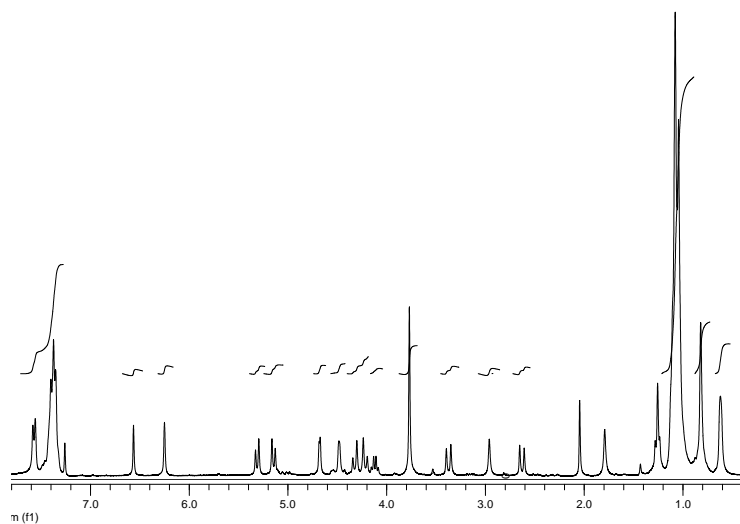
Figura A.8. Representación de la estructura molecular de **46**.



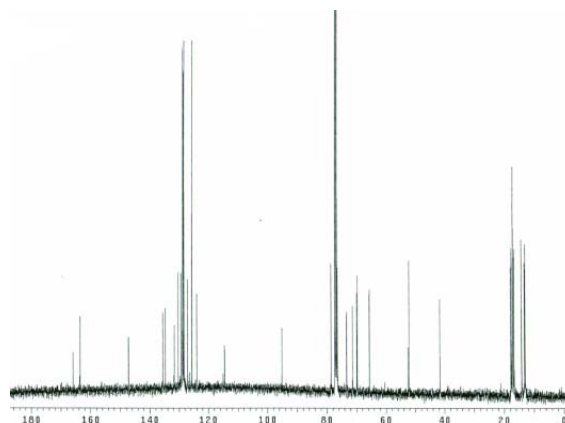
ANEXO B: ESPECTROS DE RMN SELECCIONADOS



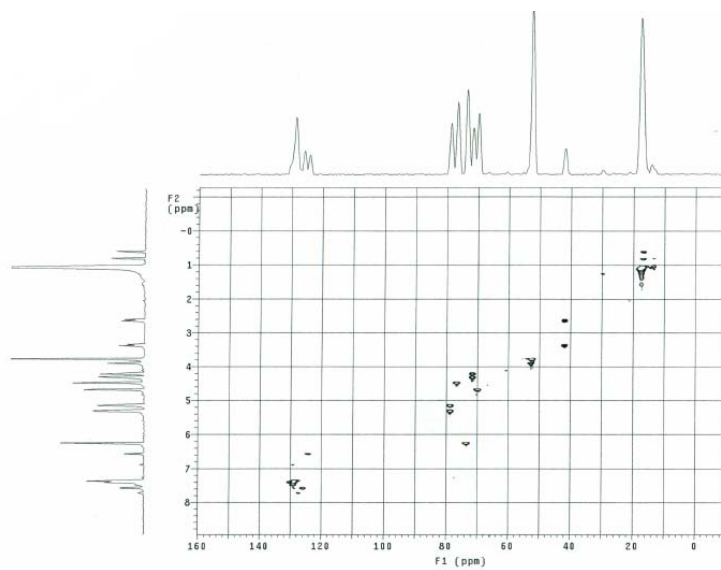
3: ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3)



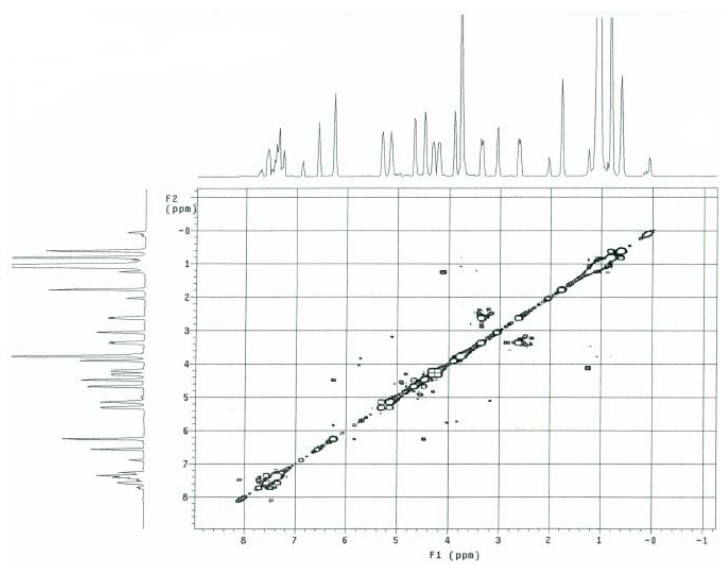
3: ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3)



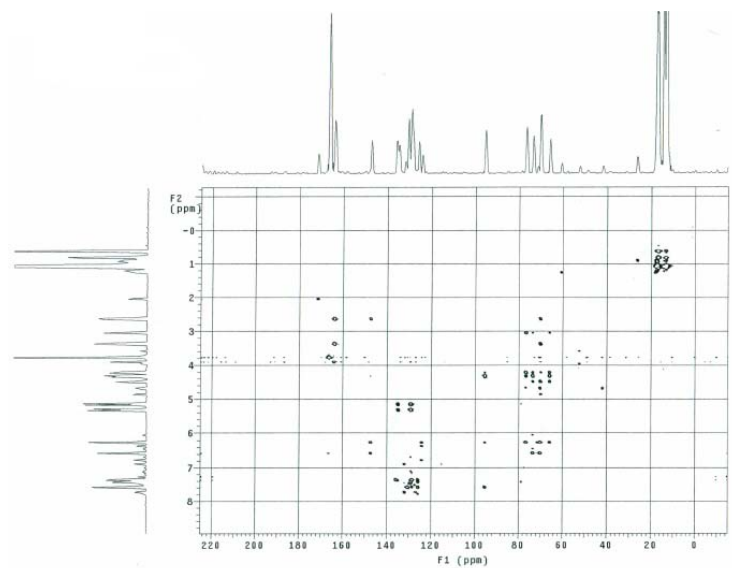
3: HSQC



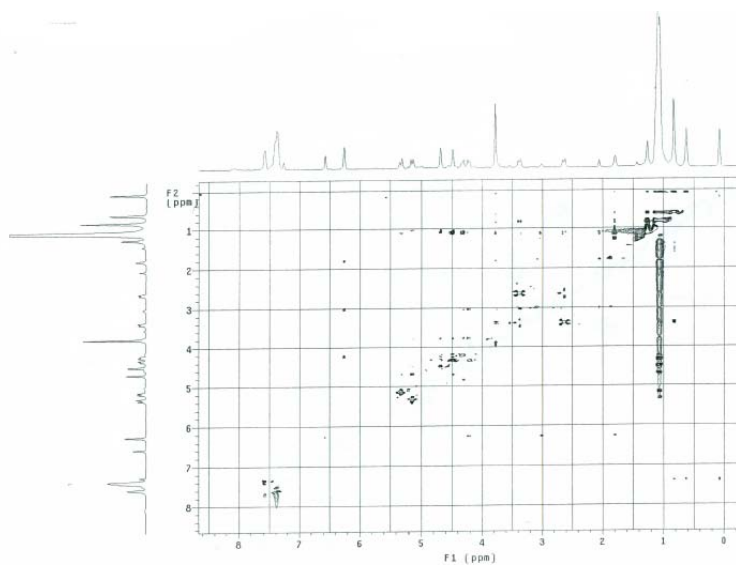
3: COSY

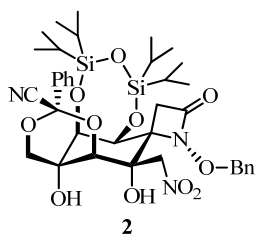


3: HMBC

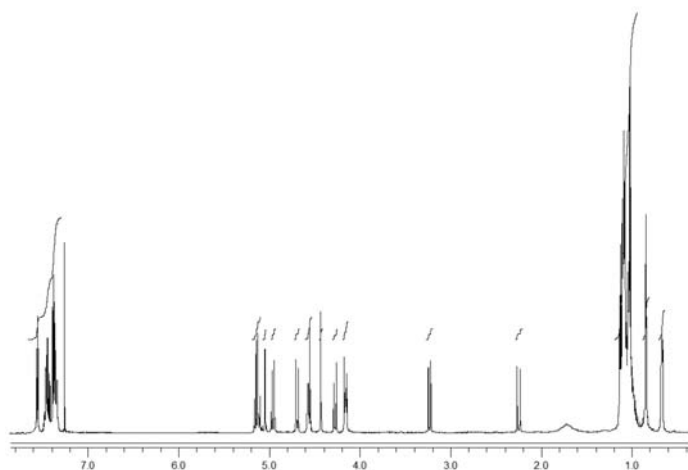


3: NOESY

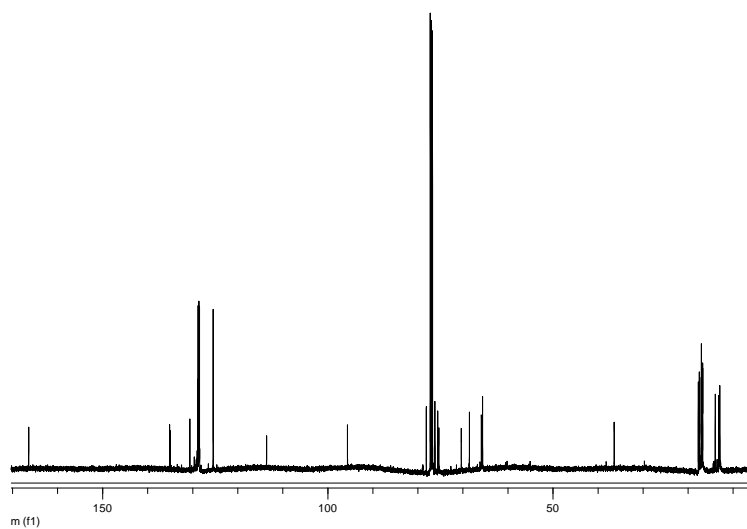




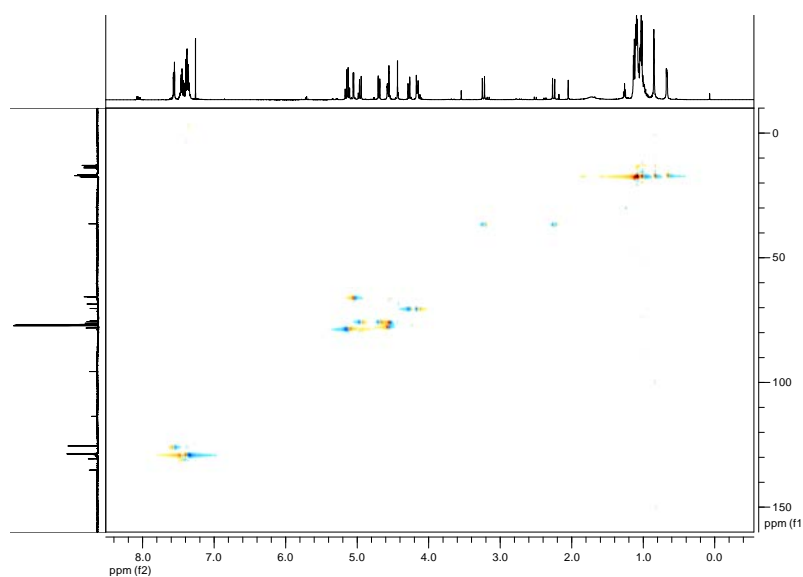
2: ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃)



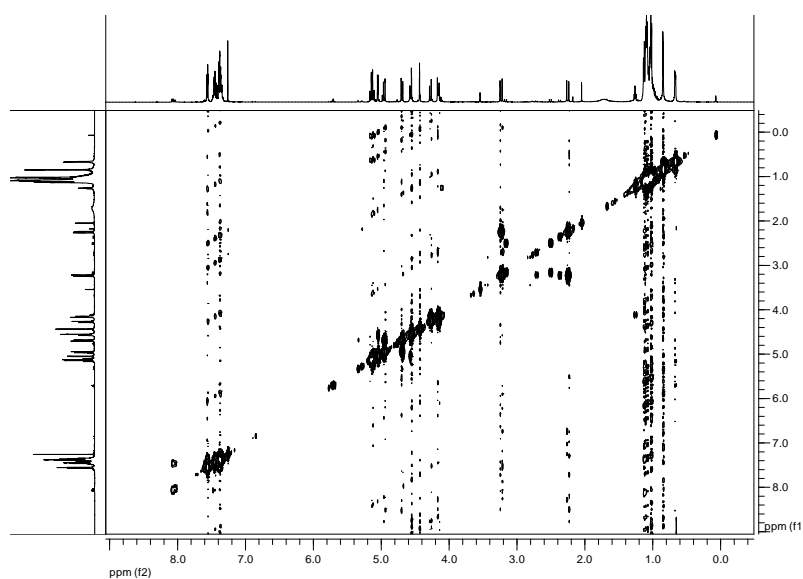
2: ¹³C-RMN (125 MHz, CDCl₃)



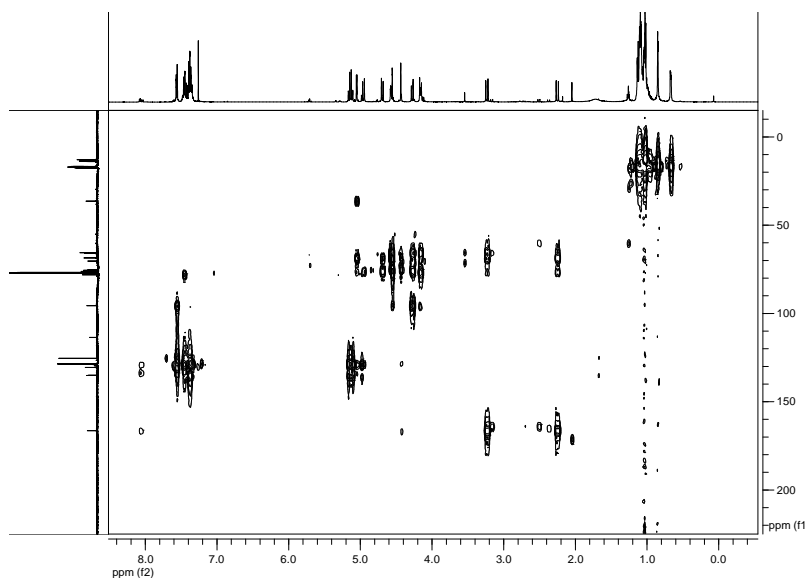
2: HSQC



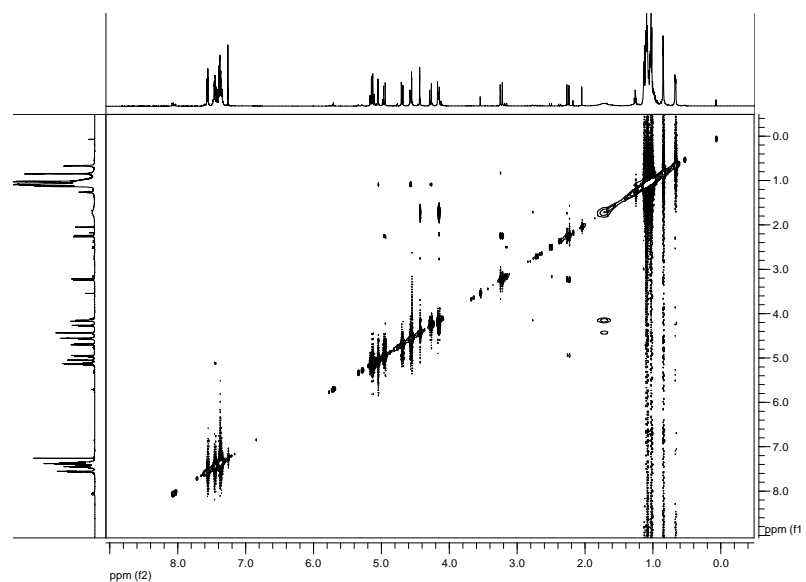
2: COSY

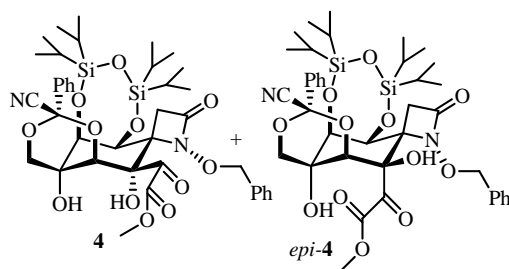


2: HMBC

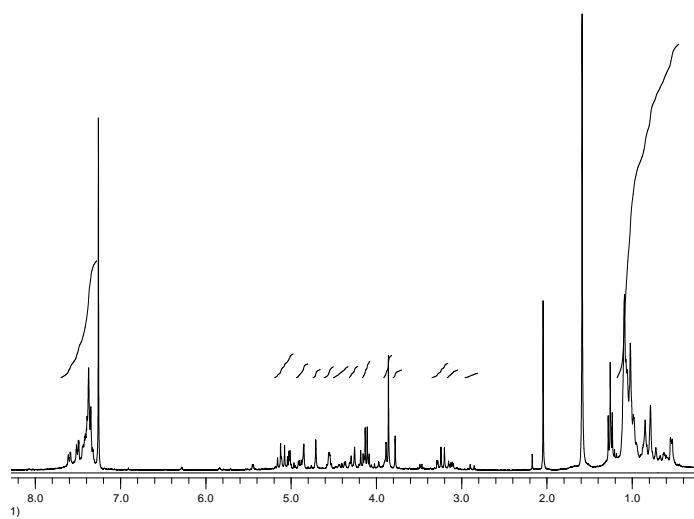


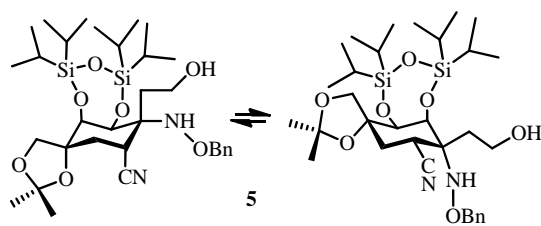
2: NOESY



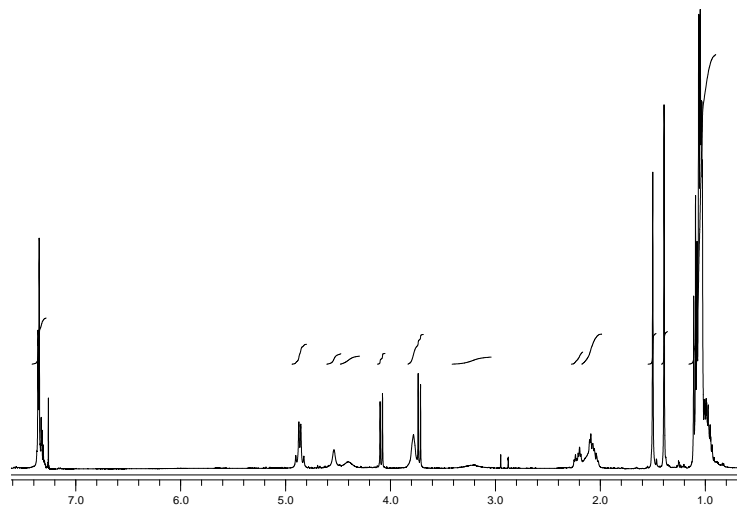


4 y *epi-4*: ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃)

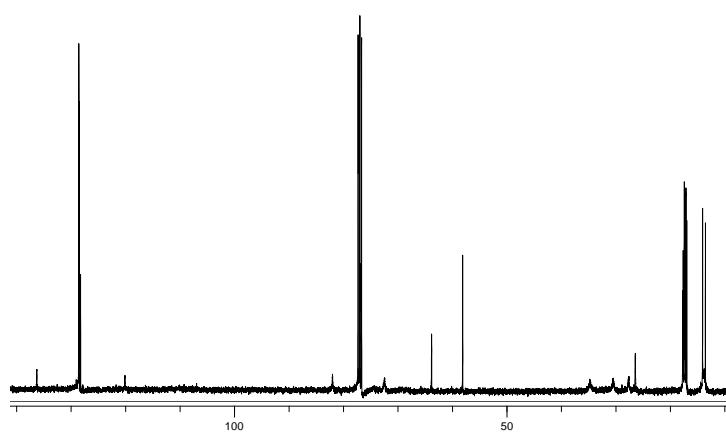




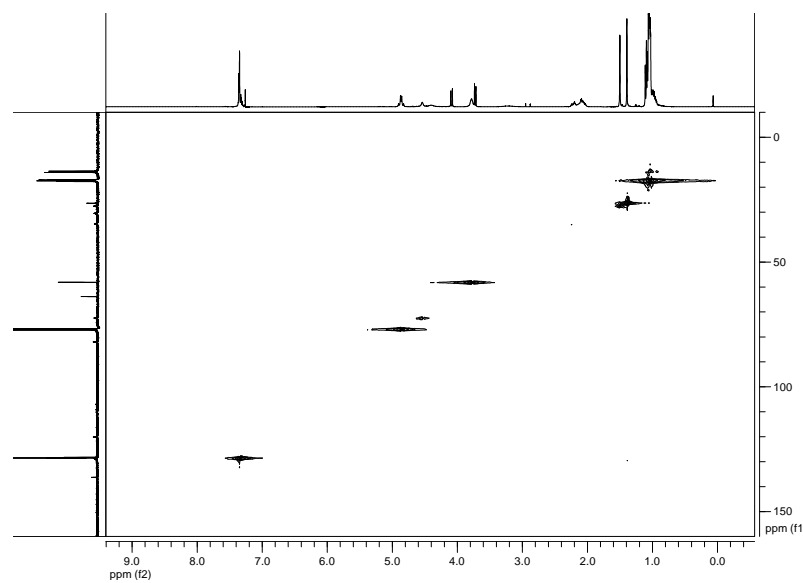
5: ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3)



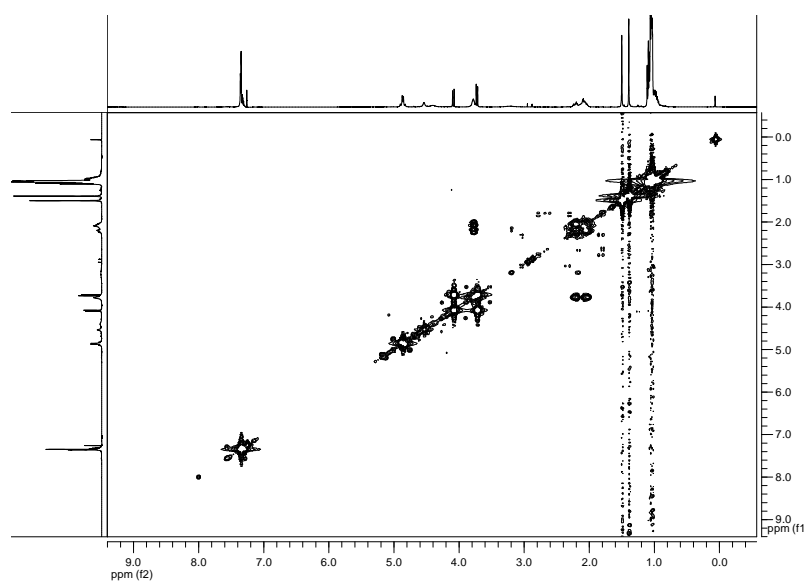
5: ^{13}C -RMN (100 MHz, CDCl_3)



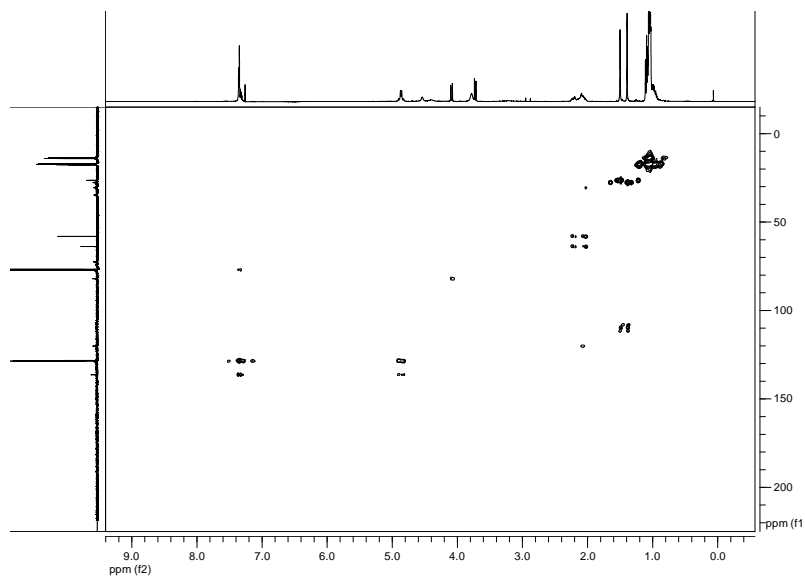
5: HSQC



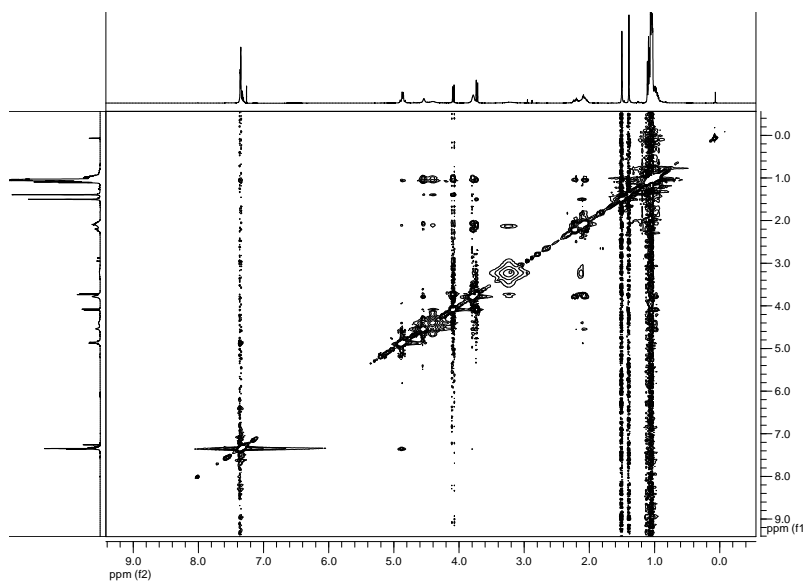
5: COSY



5: HMBC



5: NOESY



*ANEXO C: LISTADO DE DOCUMENTOS DE PATENTES DIRIGIDAS
HACIA LA SÍNTESIS TOTAL DE TTX*

LISTADO DE DOCUMENTOS DE PATENTES DIRIGIDAS HACIA LA SÍNTESIS TOTAL DE TTX

A continuación, se puede observar un listado de documentos de las patentes que se han generado en nuestro grupo de investigación durante el periodo de realización de la presente Tesis Doctoral y en las cuales Dña. Nuria Tabarés Cantero aparece como coinventora.

Listado de Documentos de Patentes

Mayo 2012

1	New Spirolactams and Their Synthesis. Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> Número de Solicitud: EP04380104.2 Fecha de Prioridad: 10/05/2004 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (16/11/2005); EP1595865A1
2	New Spirolactams and Their Synthesis. Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> Número de Solicitud: P200401123 Fecha de Prioridad: 10/05/2004 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: España Estado: Publicada ES2245592A

3	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: US10/846,466</p> <p>Fecha de Prioridad: 14/05/2004</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: USA</p> <p>Estado: Publicada US2005/0250759</p>
4	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: PCT/EP2005/005146</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005); WO2005/108356</p>
5	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: CA2,566,417</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: CANADA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005)</p>

6	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: CN200580021942,7</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: CHINA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (22/09/2007)</p>
7	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud:</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Japón (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005)</p>
8	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: US 11/568,897</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: USA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005)</p>

9	<p>New Spirolactams and Their Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: EPO5741953,3</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (11/04/2007)</p>
10	<p>Regioselective Hydroxylation, Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: EP04076477.1</p> <p>Fecha de Prioridad: 20/05/2004</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (23/11/2005); EP1598336A1</p>
11	<p>Regioselective Hydroxylation, Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: P200401285</p> <p>Fecha de Prioridad: 27/05/2004</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: España</p> <p>Estado: Publicada; ES224594A1</p>

12	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams. Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> Número de Solicitud: US 10/853,639 Fecha de Prioridad: 25/05/2004 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: USA Estado: Publicada US2005/7297788</p>
13	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams. Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: PCT/EP2005/005149 Fecha de Prioridad: 10/05/2005 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (17/11/2005); WO2005/108357</p>
14	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams. Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: CA2,566,420 Fecha de Prioridad: 10/05/2005 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: CANADA (PCT) Estado: Publicada (17/11/2005)</p>

15	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: CN200580022094,1</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: CHINA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (22/09/2007)</p>
16	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: EP05739512,1</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (31/01/2007)</p>
17	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud:</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Japón (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005)</p>

18	<p>Regioselective Functionalization and Protection of Spirolactams.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: US 11/568,902</p> <p>Fecha de Prioridad: 10/05/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: USA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada (17/11/2005)</p>
19	<p>Regioselective Hydroxylation, Functionalization and Protection of Spirolactams II.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; Tabarés Cantero, N, Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: EP04380295.8</p> <p>Fecha de Prioridad: 30/12/2004</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (05/07/2006); EP1676836A1</p>
20	<p>Regioselective Hydroxylation, Functionalization and Protection of Spirolactams II.</p> <p>Noheda Marín, P.; Bernabé Pajares, M.; Maroto Quintana, S.; Tabarés Cantero, N, Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: 11/047,860</p> <p>Fecha de Prioridad: 01/02/2005</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: USA</p> <p>Estado: Publicada (05/07/2006); US2006/0148778</p>

21	Synthesis of Tetrodotoxin, Its Analogues and Intermediates Thereof. Noheda Marín, P.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R.; Hojas García, E.; Garayalde Hernandez, D.; Lozano Gordillo, L. M. Número de Solicitud: EP07380128.4 Fecha de Prioridad: 08/05/2007 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Presentada
22	Substituted Quinazoline Compounds, Their Preparation and Use as Intermediates. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: 05000179.1 Fecha de Prioridad: 07/01/2005 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Presentada
23	Substituted 2-Amino-quinazolin-4-CN Compounds for Use in the Treatment of CNS Disorders, Pain, Stroke, Addiction and Epilepsy, Their Preparation and Use as Intermediates. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: PCT/EP2006/000055 Fecha de Prioridad: 05/01/2006 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Presentada

24	<p>Substituted 2-Amino-quinazolin-4-CN Compounds for Use in the Treatment of CNS Disorders, Pain, Stroke, Addiction and Epilepsy, Their Preparation and Use as Intermediates.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: PCT/EP2006/000096</p> <p>Fecha de Prioridad: 09/01/2006</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (13/07/2006); WO2006/072588</p>
25	<p>Substituted 2-Amino-quinazolin-4-CN Compounds for Use in the Treatment of CNS Disorders, Pain, Stroke, Addiction and Epilepsy, Their Preparation and Use as Intermediates.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: CA2,592,455</p> <p>Fecha de Prioridad: 09/01/2006</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: CANADA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada; CA2592455</p>

26	Substituted 2-Amino-quinazolin-4-CN Compounds for Use in the Treatment of CNS Disorders, Pain, Stroke, Addiction and Epilepsy, Their Preparation and Use as Intermediates. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: EP06701826.7 Fecha de Prioridad: 09/01/2006 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada
27	Substituted Quinazolin Compounds, Their Preparation and Use as Medicaments. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: 200680001768.4 Fecha de Prioridad: 09/01/2006 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: CHINA (PCT) Estado: Publicada
28	Substituted Quinazolin Compounds, Their Preparation and Use as Medicaments. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: 2007-549863 Fecha de Prioridad: 09/01/2006 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Japón (PCT) Estado: Publicada

29	<p>Substituted Quinazolin Compounds, Their Preparation and Use as Medicaments.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: MX/a/2007/008233</p> <p>Fecha de Prioridad: 09/01/2006</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: MEXICO (PCT)</p> <p>Estado: Publicada</p>
30	<p>Substituted Quinazolin Compounds, Their Preparation and Use as Medicaments.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; Lozano Gordillo, L. M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: US11/794882</p> <p>Fecha de Prioridad: 09/01/2006</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: USA (PCT)</p> <p>Estado: Publicada</p>
31	<p>Dimethano-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-Spiro Derivatives, Process for Their Synthesis and Uses Thereof.</p> <p>Noheda Marín, P.; <u>Tabarés Cantero, N.</u></p> <p>Número de Solicitud: EP06380219.3</p> <p>Fecha de Prioridad: 28/07/2006</p> <p>Solicitante: Wex Pharmaceuticals</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (30/01/2008); EP1882692</p>

32	Dimethano-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-Spiro Derivatives, Process for Their Synthesis and Uses Thereof. Noheda Marín, P.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> Número de Solicitud: PCT/EP2007/057765 Fecha de Prioridad: 27/07/2007 Solicitante: Wex Pharmaceuticals País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (31/01/2008); WO2008012361A2
33	Rearrangement of Spirolactams and Compounds Obtained Thereby. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: EP06380204.5 Fecha de Prioridad: 19/07/2006 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (20/02/2008); EP1889840
34	Rearrangement of Spirolactams and Compounds Obtained Thereby. Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: PCT/EP2007/057414 Fecha de Prioridad: 18/07/2007 Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (24/01/2008); WO2008009695A

35	<p>1-Azaspiro[3.5]nonan-2-ona-5,7-carbolactone and 5,7-Protected-1-azaspiro[3.5]nona-2-one Derivatives and Their Use as Intermediates in the Synthesis of TTX.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.; Hojas García, E.</p> <p>Número de Solicitud: EP07380033.6</p> <p>Fecha de Prioridad: 12/02/2007</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (13/08/2008); EP1956024A</p>
36	<p>1-Azaspiro[3.5]nonan-2-ona-5,7-carbolactone and 5,7-Protected-1-azaspiro[3.5]nona-2-one Derivatives and Their Use as Intermediates in the Synthesis of TTX.</p> <p>Noheda Marín, P.; Maroto Quintana, S.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.; Hojas García, E.</p> <p>Número de Solicitud:</p> <p>Fecha de Prioridad: 12/02/2008</p> <p>Solicitante: Laboratorios del Dr. Esteve</p> <p>País/Región: Solicitud Europea</p> <p>Estado: Publicada (21/08/2008); WO2008/098916A</p>
37	<p>TTX Intermediates Synthesis.</p> <p>Noheda Marín, P.; Lozano Gordillo, L.M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u>; Benito Arenas, R.</p> <p>Número de Solicitud: P200901409</p> <p>Fecha de Prioridad: 12/06/2009</p> <p>Solicitante: CSIC</p> <p>País/Región: España</p> <p>Estado: Presentada</p>

38	TTX Intermediates Synthesis. Noheda Marín, P. ; Lozano Gordillo, L.M.; <u>Tabarés Cantero, N.</u> ; Benito Arenas, R. Número de Solicitud: P200901409 Fecha de Prioridad: 12/06/2009 Solicitante: CSIC País/Región: Solicitud Europea Estado: Publicada (16/12/2010); WO2010/142836
-----------	---